

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät
für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-
Universität München**



**Entwicklung von Triazolobenzotriazepinen und
Triazolothienotriazepinen als selektive Inhibitoren von
Bromodomänen der BET-Familie**

Elfrun Almuth Ratzke

aus

Engelskirchen

2016

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011
von Herrn Prof. Dr. Franz Bracher betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26.01.2016

Elfrun Ratzke

Dissertation eingereicht am:	26.01.2016
1. Gutachter:	Prof. Dr. Franz Bracher
2. Gutacher:	Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder
Mündliche Prüfung am:	04.03.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Franz Bracher für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie seine engagierte und stets wohlwollende Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern der Prüfungskommission. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anja Hoffmann-Röder für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Ferner danke ich meinen Kooperationspartnern des SGC an der Universität Oxford Herrn Prof. Dr. Stefan Knapp sowie Herrn Prof. Dr. Panagis Filippakopoulos für spannende Diskussionen über Testergebnisse und die weitere Strukturoptimierung. Des Weiteren gilt mein Dank Dr. Sarah Picaud und Dr. Oleg Fedorov für die Durchführung aller Testungen in Oxford.

Den Teams der Analytikabteilungen der Chemie und Pharmazie um Herrn Dr. Werner Spahl für die Aufnahmen der Massenspektren sowie Dr. Lars Allmendinger und seinen Mitarbeiterinnen, darunter besonders Claudia Glas, für die Durchführung NMR- und IR-spektroskopischer Messungen danke ich. Zudem gebührt mein Dank Frau Martina Stadler für die Durchführung des Agar-Diffusions-Tests und des MTT-Assays sowie Dr. Christoph Müller für die Messung von HPLC-Reinheiten.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Arbeitskreises für die schöne gemeinsame Zeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Sebastian Dittrich und Nghia Ong für die Weitergabe ihres Wissens sowie die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Zudem danke ich Tobias Popp, Katharina Vögerl und Tim Tremmel, die auch in späteren Abendstunden im Labor nie die Motivation und den Humor verloren haben.

Bei meinen Laborkollegen Prof. Dr. Theodor Severin, Ursula Kopp sowie Alexandra Kamlah möchte ich mich für eine angenehme Atmosphäre im Labor bedanken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, allen voran meiner Schwester Esther, wie auch meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihre Geduld.

...für Tobi

und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aufbau der Chromosomen	1
1.2 Epigenetik	2
1.2.1 DNA-Methylierung	3
1.2.2 Modifikationen von Histonen	4
1.3 Bromodomänen	7
1.3.1 BET-Familie	9
1.4 Bekannte Inhibitoren der BET-Familie	11
1.4.1 Triazolobenzodiazepine und Triazolobenzotriazepine als Inhibitoren der Bromodomänen der BET-Familie	13
2. Themenstellung und Syntheseplanung	17
2.1 Themenstellung	17
2.2 Syntheseplanung	19
2.2.1 Synthese von Triazolobenzotriazepinen mit verschiedenen Substituenten an C-8 und C-9	19
2.2.2 Synthese der Triazolothienotriazepine	21
3. Ergebnisse und Diskussion	25
3.1 Synthesen der 8-Aminotriazolobenzotriazepinderivate	25
3.1.1 Ergebnisse und Diskussion des Screenings der funktionalisierten 8-Aminotriazolobenzotriazepine	26
3.2 Synthese von Triazolobenzotriazepinen mit verschiedenen Modifikationen an C-9	32
3.2.1 Synthese des Aminobenzophenons	32
3.2.2 Synthese des 9-Bromotriazolobenzotriazepins 30	33
3.2.3 Knüpfung von C-N-Bindungen mittels Übergangsmetall-katalysierter Kreuzkupplungen an C-9	35
3.2.3.1 Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung an C-9	35
3.2.3.2 Direkte Aminierung an C-9	37
3.2.4 Funktionalisierung des 9-Aminotriazolobenzotriazepins 32	39

3.2.5 Funktionalisierung an C-9 des 9-Bromtriazolotriazepins 30 unter C-C-Knüpfung	40
3.2.6 Ergebnisse und Diskussion des Screenings der funktionalisierten 9-Aminotriazolobenzotriazepine	42
3.3 Synthesen der Triazolothienotriazepine	46
3.3.1 Synthesen der 2-Aminothiophen-Grundbausteine.....	47
3.3.2 Synthese der PMB-geschützten JQ1-Analoga	50
3.3.3 Einführung neuer Benzylreste an den JQ1-Analoga.....	55
3.3.4 Ergebnisse und Diskussion der Screenings der JQ1-Analoga.....	57
3.3.5 Vergleich der JQ1-Analoga mit analog substituierten Triazolobenzotriazepinen.....	62
3.4 Formulierung eines neuen Zielmoleküls durch Kombination der Ergebnisse aus den Serien der JQ1-Analoga und der Triazolobenzotriazepine	64
3.4.1 Versuche zur Synthese des 2-Bromtriazolothienotriazepins 52	65
3.4.2. Versuche zur Synthese des 2-Nitrotriazolothienotriazepins 57	67
3.4.3 Synthese des am Thiophenring unsubstituierten Triazolothienotriazepins.....	69
3.4.4 Versuche zur Einführung von Substituenten an C-2.....	71
3.4.5 Direkte Metallierung von 62 mit starken Basen und weitere Umsetzung zu Triazolothienotriazepin-2-carbonsäure 77	75
3.4.6 Einführung eines Stickstoffsubstituenten an C-2 mittels Umlagerungsreaktionen.....	77
3.4.7 Ergebnisse und Diskussion der Screenings der an C-2 substituierten Triazolothienotriazepine	83
4. Biologische Testung	87
4.1 Hintergründe zu den zur Strukturoptimierung verwendeten biologischen Testungen ..	87
4.2 <i>Thermal Shift Assay</i>	87
4.3 AlphaScreen	90
4.3.1 Ergebnisse und Diskussion der Messungen mittels AlphaScreen	92
4.4 Co-Kristallisation	94
4.5 Weitere biologische Testungen	95
4.5.1 Agar-Diffusionstest.....	95
4.5.1.2 Ergebnisse und Diskussion des Agar-Diffusionstests.....	96
4.5.2 MTT-Test	98
4.5.2.1 Ergebnisse und Diskussion der MTT-Tests.....	99

5. Zusammenfassung	101
6. Experimenteller Teil	113
6.1 Verwendete Materialien	113
5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften	116
5.3 Synthesevorschriften	120
7. Abkürzungsverzeichnis	265
8. Literaturverzeichnis	269

1. Einleitung

1.1 Aufbau der Chromosomen

Die genetische Erbinformation ist in allen Zellen eines Lebewesens auf der Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorhanden. Um die im Menschen ca. 2 m lange DNA in einen 6 μm großen Zellkern zu komprimieren, liegt diese in kondensierter Form als Chromosomen vor.^[1] Das menschliche Genom besteht aus 46 Chromosomen, welche aus Chromatin aufgebaute, flexible Makromolekülkomplexe sind. Chromatin setzt sich aus DNA und Proteinen zusammen. Die Hälfte aller Proteine in diesen komplexen Molekülen bilden wiederum die Histone. Die DNA windet sich um die scheibenförmigen Histone und bildet somit das Nukleosom.^[2] Mit Hilfe noch anderer Strukturproteine können die Nukleosomen sehr dicht gepackt werden und einen filamentösen Komplex bilden (Abb. 1).^[3]

Histone sind Proteinoktamere, welche jeweils aus Dimeren der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 bestehen und insgesamt eine Größe von nur 10 - 15 kDa aufweisen.^[4] Die Histone enthalten vermehrt Aminosäuren mit basischen, unter physiologischen Bedingungen protonierten und somit positiv geladenen Resten, so dass sich die doppelsträngige DNA auf Grund des negativ geladenen Rückgrats aus alternierenden Phosphat- und Zuckeruntereinheiten^[5] um diese Proteinoktamere wickeln kann. Dabei winden sich jeweils etwa 147 Basenpaare der DNA 1.65 mal um ein Histon.^[4, 6]

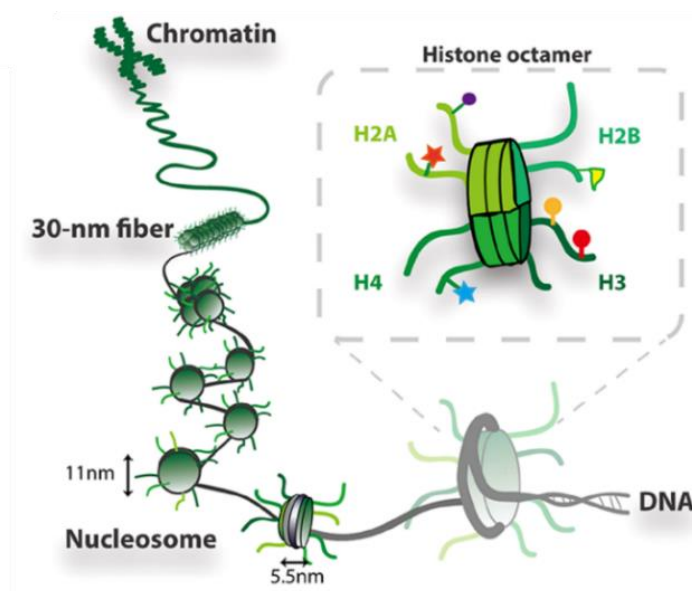


Abbildung 1.1: DNA und Histonproteinoktamere bilden die Nukleosomen. Kettenförmig aneinander gereihete Nukleosomen bilden Filamente, die das Chromatin aufbauen.^[3]

Zwischen den einzelnen Histonen befinden sich 80 Basenpaare der Linker-DNA, die von Histon 1 ummantelt ist.^[7] Am C-Terminus der Histone H2A, H2B, H3 und H4 befinden sich drei α -Helices, die mit anderen Histonen wechselwirken. Die N-terminalen Enden der Histone stehen aus dem Nukleosom heraus und unterliegen erhöht posttranslationalen Modifikationen (PTM).^[6, 8]

Chromatin kann sowohl kondensiert (Heterochromatin) als auch dekondensiert (Euchromatin) vorliegen. Im dekondensierten Zustand ist das Ablesen der Erbinformationen sowie das Duplizieren der DNA möglich. Es existieren zwei unterschiedliche Varianten von Heterochromatin: das konstitutive und das fakultative Heterochromatin.^[6] Das permanent kondensierte, konstitutive Heterochromatin repräsentiert die auf der DNA vorhandenen Gene dauerhaft. Zu diesem konstitutiven Heterochromatin gehören Regionen wie die Zentromere und die Telomere.^[9] Das fakultative Heterochromatin beinhaltet Gene, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten, in unterschiedlichen Entwicklungsstadien bzw. Differenzierungen unterdrückt werden.^[6] Neben Proteinen, die temporär als Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren agieren, können auch epigenetische Faktoren die Chromatinstruktur und somit die Aktivität eines Gens beeinflussen.

1.2 Epigenetik

Obwohl in jeder Zelle eines Organismus die gleiche DNA vorhanden ist, sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen zu erkennen. Doch wie wird reguliert, welche Gene transkribiert werden und wieso teilt sich eine Muskelzelle in neue Muskelzellen und nicht in Zellen einer anderen Art? Die Epigenetik bietet eine Erklärung für dieses Phänomen. In der Epigenetik werden DNA oder Proteine so modifiziert, dass die Aktivität eines Gens temporär verändert wird.^[10] Diese Information über die Aktivierung oder Inaktivierung eines Gens kann auch mitotisch oder meiotisch an Tochterzellen weitervererbt werden, ohne dass eine Mutation in der DNA-Sequenz vorliegt.^[11]

In der Epigenetik gibt es zwei primäre Regulationsmechanismen: die Veränderung der DNA durch Methylierung und die posttranslationale Modifizierung von Histonen.^[12]

1.2.1 DNA-Methylierung

Die am besten erforschte epigenetische Modifizierung ist die Methylierung der DNA. Dies ist ein interessanter Forschungsbereich, da die DNA-Methylierung fundamentale zelluläre Prozesse reguliert, z. B. die embryonale Entwicklung, die X-Chromosom-Inaktivierung und die Stabilisierung der Chromosomen. Auf Grund dieser wichtigen Rolle sind viele Krankheiten wie Krebs und abnormale embryonale Entwicklungen auf abweichende DNA-Methylierung zurückzuführen.^[13]

Die Enzyme aus der Familie der DNA-Methyltransferasen^[14] übertragen bei der DNA-Methylierung eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf ein Cytosin an Position 5^[15]. DNA-Methylierungen werden immer mit einer Repression der Transkription assoziiert^[16] und finden fast ausschließlich in Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotiden (CpG) statt (Abb. 1.2). Im Genom liegen CpGs im starken Ausmaß methyliert vor.^[17] Auch repetitive DNA-Abschnitte sowie parasitäre DNA-Abschnitte endogener Retroviren und Transposons werden hypermethyliert, so dass diese nicht exprimiert werden.^[18] CpG-Inseln sind DNA-Abschnitte von etwa 1000 Basenpaaren mit hoher CpG-Dichte.^[19] Ungefähr 60 % aller menschlichen Genpromotoren beinhalten CpG-Inseln, welche in normalen Zellen unmethyliert vorliegen, wodurch das Gen aktiv ist. Etwa 6 % der CpG-Inseln werden jedoch gewebespezifisch bei der Entwicklung methyliert.^[20]

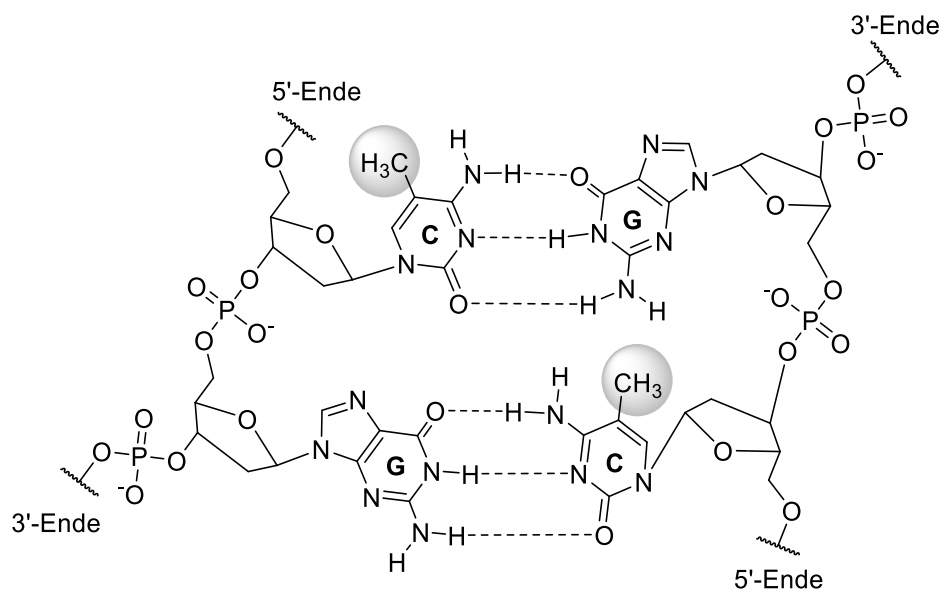


Abbildung 1.2: Doppelsträngige DNA mit CpG-Palindrom, welche am Cytosin in Position 5 methyliert vorliegt.

An den komplementären DNA-Strängen werden beide Cytosine einer CpG-Insel methyliert, so dass ein palindromisches Methylierungsmuster entsteht und das Gen infolgedessen durch verschiedene Mechanismen reprimiert wird.^[16, 19, 21] Methyliertes CpG wird von einer Methyl-CpG-bindenden-Domäne (MBD) erkannt. Die MBD-Familienmitglieder rekrutieren daraufhin Histon-modifizierende oder Chromatin-Remodeling-Komplexe, welche zu einer Verringerung der Gentranskription führen.^[22] Beim direkten Repressionsmechanismus verhindert die DNA-Methylierung, dass sich DNA-bindende Proteine an die DNA anlagern können.^[23] Im Gegensatz dazu führen unmethylierte CpG-Inseln zur erhöhten Expression, weil durch das CpG-bindende Protein Cfp1 verschiedene transkriptionsaktivierende Proteine rekrutiert werden.^[24]

Da die Methylierung der DNA auf der Knüpfung einer starken kovalenten Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung beruht, ist eine Demethylierung der DNA nur durch Basenexzisionsreparatur nach Desaminierung oder Oxidation des 5-Methylcytosins möglich.^[16] Wenn 5-Methylcytosin desaminiert wird, entsteht Thymin, welches mit Guanin eine Fehlpaarung ergibt, und so die Basenexzisionsreparatur einleitet.^[25] Auch kann die Methylgruppe des 5-Methylcytosin zur Hydroxymethylgruppe oxidiert^[26] werden. Das 5-Hydroxymethylcytosin kann anschließend entweder desaminiert^[27] oder weiter oxidiert^[28] werden. Die entstehenden Produkte werden wiederum mit Hilfe der Basenexzisionsreparatur durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt.

Der Methylierungsgrad der DNA ist von der Anwesenheit der Nukleosome abhängig.^[29] So können bestimmte Varianten von Nukleosomen, die das Histon H2A.Z enthalten, die Gene vor einer Methylierung schützen.^[30] Wobei wiederum der Umbau des Chromatins und die Positionierung der Histone sowohl von der Methylierung der DNA^[31] als auch von der Modifizierung der Histone^[32] abhängig ist.

1.2.2 Modifikationen von Histonen

Histone spielen eine Schlüsselrolle in der Epigenetik. Es gibt eine große Variation an PTMs, welche überwiegend am N-terminalen Ende der Histone, aber auch am Kern des Proteins erfolgen können.^[6] Diese modifizierten Histone wirken nicht nur direkt auf die Chromatinstruktur, sondern rekrutieren auch weitere Proteine, welche zum Umbau des Chromatins beitragen oder eine neue Positionierung der Nukleosome erreichen.^[32] Veränderungen in den PTMs der Histone können zu Krebs, neuropsychiatrischen oder metabolischen Störungen sowie Entzündungen führen.^[33]

Im Gegensatz zur „simplen“ Methylierung der DNA gibt es in der Epigenetik eine hohe Diversität an Histonmodifikationen. Diese PTMs erfolgen an unterschiedlichen Aminosäureseitenketten und haben sehr verschiedene Auswirkungen auf die Chromatinstruktur und andere Proteine. Unter anderem gibt es Modifikationen wie die mono-O-Glykosylierung mit β -*N*-Acetylglucosamin^[34], die Poly-ADP-Ribosylierung^[35] oder auch das Modifizieren der Aminosäuren mit kleinen Proteinen wie Ubiquitin^[36] und SUMO^[37]. Durch das Enzym Cathepsin L können Aminosäuren am N-terminalen Ende des Histons entfernt^[38] werden. Eine Prolin-Isomerase verändert die Konformation dieser Aminosäure in Histonen.^[39] Die weitaus wichtigsten und auch bestuntersuchten PTMs der Histone sind jedoch die Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung.

Die Phosphorylierung der Histone findet überwiegend am N-terminalen Ende der Histone an den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin (Abb. 1.3) statt und ist hoch dynamisch. An Histonen existieren nur sehr wenige spezifische Phosphorylierungspositionen.^[40] Kontrolliert wird diese Modifikation durch verschiedene Kinasen und Phosphatasen, welche die Phosphatreste hinzufügen bzw. wieder entfernen.^[41] Durch die Phosphorylierung werden neutrale Aminosäureseitenketten der Histone negativ geladen, was in einer Veränderung der Chromatinstruktur resultiert. In der Mitose erfolgt eine genomweite Phosphorylierung von H3S10, was eine starke Chromatinkondensation hervorruft.^[40]

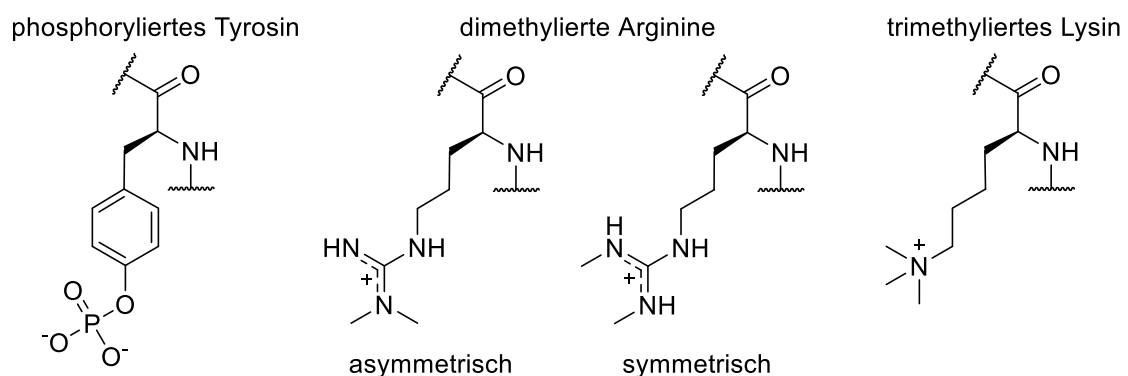


Abbildung 1.3: Epigenetische Modifikationen an Aminosäureseitenketten.

Methylierungen können an vielen verschiedenen Positionen in Histonen an den Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin erfolgen. Im Gegensatz zur Phosphorylierung ändert sich die Ladung der Aminosäureseitenkette bei der Methylierung nicht und somit hat die Methylierung auch keinen direkten Effekt auf die Chromatinstruktur. Es sind dafür mehrere Formen dieser Modifizierung vorhanden, da Lysine mono-, di-, oder trimethyliert und Arginine mono- oder symmetrisch oder asymmetrisch dimethyliert (Abb. 1.3) vorliegen können.^[42] Alle Histon-Lysin- und Arginin-Methyltransferasen transferieren eine Methylgruppe von

S-Adenosylmethionin entweder auf die ϵ -Aminogruppe des Lysins oder auf die ω -Guanidingruppe des Arginins.^[6] Die methylierten Aminosäureseitenketten werden an den spezifischen Positionen im Histon von vielen unterschiedlichen Domänen^[43] erkannt, welche somit auch sehr diverse Antworten hervorrufen. So kann eine Trimethylierung eines Lysins an der einen Position eine Aktivierung^[44], an einer anderen Stelle jedoch eine Reduktion der Transkription^[45] hervorrufen. Oft werden auch weitere Proteine rekrutiert, welche das Chromatin modifizieren oder auch Nukleosome repositionieren.^[6]

Die Acetylierung erfolgt an der ϵ -Aminogruppe von Lysinen (Abb. 1.4) und ereignet sich überwiegend am N-terminalen Ende, aber auch am Kern der Histone.^[46] Diese Modifizierung ist wie die Phosphorylierung hoch dynamisch und wird durch zwei Enzymfamilien reguliert, die Histonacetyltransferasen (HAT) und die Histondeacetylasen (HDAC). Schon 1976 wurde erstmalig entdeckt, dass eine Acetylierung an Histonlysinen aktivierend auf das Chromatin wirkt.^[47] Diese Aktivierung beruht auf der Neutralisation der positiven Ladung des protonierten Lysins durch die Bildung der neutralen Amidbindung, welche eine Ablösung der negativ geladenen DNA vom Histon hervorruft.^[48] Es bildet sich eine dekondensierte Chromatinstruktur infolge der Entfernung von Nukleosomen auf der DNA. Durch die Bildung des dekondensierten Chromatins erfolgt eine Aktivierung der Transkription.^[48-49]

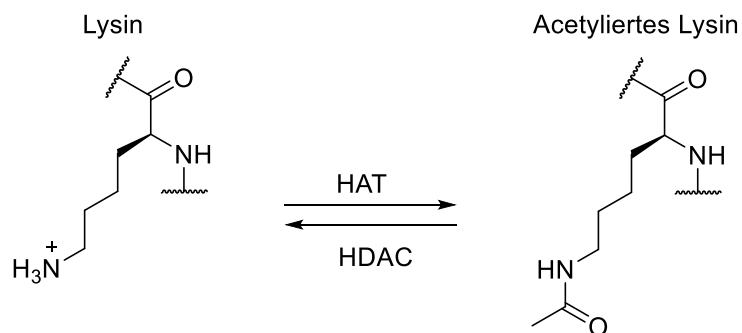


Abbildung 1.4: Durch die Acetylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins mit einer HAT wird die positive Ladung neutralisiert. Eine HDAC entfernt die Acetylgruppe des Lysins.

1.3 Bromodomänen

Es gibt zahlreiche verschiedene Proteine, welche posttranslationale Modifikationen auslesen. Diese sind strukturell sehr unterschiedlich und besitzen eine oder mehrere Erkennungsdomänen. ϵ -N-Acetylierte Lysine (KAc) auf Histonen werden von Bromodomänen erkannt, welche evolutionär stark konserviert sind (Abb.1.5 A).^[50] Erstmals entdeckt wurden Bromodomänen 1992 von J. W. Tamkun *et al.*^[51], die bei der Untersuchung des *Drosophila melanogaster*-Gens *brahma* auf ein neues Strukturmotiv stießen, welches ähnlich wie Chromodomänen Einfluss auf die Chromatinstruktur nimmt.

Das menschliche Proteom kodiert 61 verschiedene Bromodomänen in 46 unterschiedlichen Proteinen.^[50] In den Proteinen sind immer ein bis zwei Bromodomänen vorhanden^[52], nur der Bromodomänen-Proteinkomplex PBAF hat eine Untereinheit mit sechs Bromodomänen (PB1).^[53] Die Bromodomänen werden in acht Unterfamilien eingeteilt (Abb.1.5 B).^[52] Die zweite Unterfamilie, welche *bromodomains and extra-terminal domain* (BET)-Familie genannt wird, ist die am besten untersuchte.

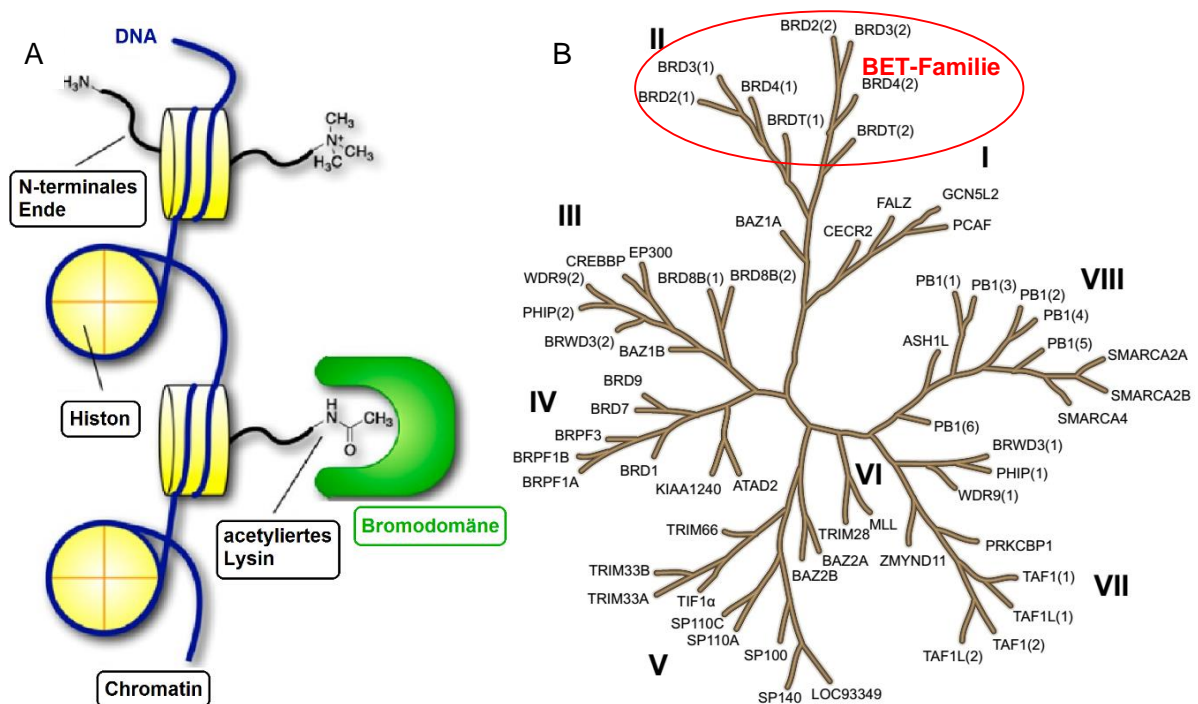


Abbildung 1.5: A) Eine ϵ -N-acetylierte Aminogruppe eines Lysins am N-terminalen Histoneende wird von einer Bromodomäne erkannt.^[54] B) Phylogenetischer Baum der Bromodomänen.^[54] Die Subfamilien werden in römischen Zahlen angegeben. Die BET-Familie ist rot markiert.

Proteine, die Bromodomänen enthalten, übernehmen essenzielle Aufgaben im Zellkern und spielen bei vielen Krankheiten eine Rolle. MLL ist eine Bromodomänen-enhaltende

Histonmethyltransferase, welche in chromosomalen Translokationen mitwirkt.^[55] Die Translokationen können zur Bildung von Fusionsproteinen führen, welche akute lymphatische Leukämie oder akute myeloische Leukämie auslösen.^[56] Das Multidomänenprotein CREBBP (*cAMP response element-binding protein*) agiert als Histonacetyltransferase.^[57] CREBBP ist damit ein Transkriptionscoaktivator, der neben einer Acetyltransferasedomäne und einer Bromodomäne mehrere Zinkfingerdomänen sowie die CREB-bindende-Domäne aufweist.^[58] Ein Gendefekt in CREBBP verursacht das Rubinstein-Taybi-Syndrom, eine kognitive Dysfunktion.^[59] Zudem ist CREBBP ein Target von Präsenilinen, welche das Erinnerungsvermögen sowie das Überleben von Neuronen regulieren.^[60] Ein weiterer Multidomänenproteinkomplex ist PBAF mit der Polybromodomänenuntereinheit PB1. PBAF fungiert als Chromatin-Remodeling-Komplex.^[53] PB1 erkennt spezifische Acetylierungsmuster und kontrolliert die Erreichbarkeit der DNA durch das Auflockern des Chromatins.^[61] Andere Bromodomänen-enthaltende Proteine sind z. B. SMARCA5 (Helikasen)^[62], KAP1 (Transkriptionsregulator)^[63] oder TAFII250 (Transkriptionsinitiator)^[64].

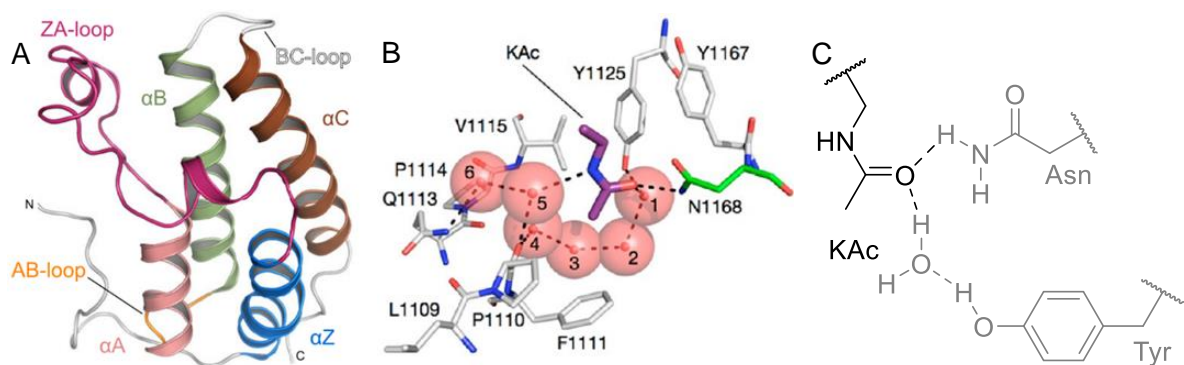


Abbildung 1.6: A) Struktur der Bromodomäne BRD4(1) mit markierten Sekundärstrukturen.^[50] B) Kristall (PDB3P1C) einer CREBBP-Bromodomäne im Komplex mit einem ε-N-acetylierten Lysin. Der KAc-Rest (Violett) bindet über den Sauerstoff der N-Acetylgruppe an die NH₂-Gruppe des in allen Bromodomänen stark konservierten Asparagins (grün) und über eine Wassermolekül an die Hydroxygruppe eines Tyrosins. Auch die konservierten Wassermoleküle sind als rote Sphären zu erkennen.^[54] C) Schematische Darstellung der KAc-Bindung zum Asparagin und Tyrosin.

Obwohl es viele divergente Bromodomänenproteine mit wenigen Sequenzhomologien gibt, sind die Bromodomänen stark konservierte Erkennungsdomänen. Diese bestehen aus etwa 110 Aminosäuren.^[54] Kristallstrukturen lassen vier linksgewundene Helices (αZ, αA, αB, αC) erkennen, welche durch zwei hochvariable Loops (ZA, BC) verbunden sind (Abb.1.6 A).^[50] ZA und BC-Loop sind für die spezifische Erkennung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtig und bilden zusammen mit den vier Helices eine tiefe, hydrophobe Bindungstasche für KAc. C- und N-Termini sind hoch divers und beinhalten oft noch weitere Helices. Co-Kristalle mit Peptiden zeigen, dass die KAc in tiefen Taschen gebunden werden. Hier sind jeweils ein

Tyrosin und ein Asparagin stark konserviert, denn diese erkennen das KAc und binden dieses über Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 1.6 B und 1.6 C).^[54, 65] Dabei bindet die NH₂-Gruppe des Asparagin-Carboxamids direkt über eine Wasserstoffbrücke und die Tyrosinseitenkette über ein Wassermolekül an den Sauerstoff der *N*-Acetylgruppe am Lysin. Insgesamt befinden sich vier konservierte Wassermoleküle in der Bindungstasche.^[54] In dem ZA-Loop sind häufig Loop-Insertionen vorhanden, die dazu führen, dass die Randregion der Bindungstasche sich substanziell verändert.^[50]

1.3.1 BET-Familie

Im phylogenetischen Baum der Bromodomänen ist die *bromodomains and extra-terminal domain* (BET)-Familie die zweite Unterfamilie (Abb.1.5 B). Diese Familie besteht aus vier Mitgliedern (BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT), mit insgesamt acht Bromodomänen, da jedes Protein zwei Bromodomänen aufweist (Abb. 1.7). Die N-terminalen Tandem-Bromodomänen (BD1 und BD2), die extraterminale Domäne (ET), die Region B sowie eine Serin-, Glutamat- und Aspartat-reiche Sequenz (SEED) befinden sich in allen BET-Proteinen. Die extraterminale Domäne wird von vielen Proteinen erkannt, welche in die Anheftung und Entfernung von epigenetischen Modifikationen eingebunden sind.^[66] Die B-Region ist wichtig für die Funktion der zweiten Bromodomäne und bei Homo- und Heterodimerisierung der BET-Proteine.^[67] Andere konservierte Regionen sind die Region A und das C-terminale Motiv (CTM). Diese Regionen sind nicht in jedem BET-Protein vorhanden und in ihrer Funktion weitestgehend unerforscht.^[68]

Bromodomänen weisen hohe Sequenzhomologien auf. Aus dem phylogenetischen Baum lässt sich erkennen, dass die größten Sequenzhomologien auf jeweils alle vier ersten Bromodomänen bzw. jeweils alle vier zweiten Bromodomänen entfallen. Noch ist nicht viel darüber bekannt, welche Aufgaben den ersten bzw. den zweiten Bromodomänen der BET-Familie zufallen. Erste Studien von unseren Kooperationspartnern in Oxford an BRD4(1) und BRD4(2) mit verschiedenen Modifizierungen an Peptiden des Histons 3 (H3) bzw. Histons 4 (H4) lassen darauf schließen, dass BRD4(1) spezielle mehrfachsubstituierte Muster (bestehend aus zwei KAc und einem phosphorylierten Threonin) an H3 und BRD4(2) nur an H4 (bestehend aus tetra-acetylierten Lysinen) erkennt.^[50] In einer weiteren Studie konnten S. Picaud *et al.*^[69] zeigen, dass die jeweils zweite Bromodomäne vor allem die Bindung am Chromatin beeinflusst.



Abbildung 1.7: Sequenz des menschlichen Proteins BRD4 mit zwei Bromodomänen (BD), zwei konservierten Regionen (A und B) einer extraterminalen Domäne (ET), einer Ser/Glu/Asp-reichen Region (SEED) und einem C-terminalen Motiv (CTM).^[65]

Die BET-Proteine BRD2, BRD3^[70] und BRD4^[71] sind Transkriptionsregulatoren. An BRD2 wurde gezeigt, dass es neben der Transkriptionsregulation auch eine Histonchaperon-Aktivität^[70] aufweist und das alternative Spleißen reguliert^[72]. BRD3 reguliert das Gen GATA-1, welches ein Erythrozyten-Transkriptionsfaktor ist.^[73] BRD4 fungiert als Transkriptionsvermittler und rekrutiert einen Elongationsfaktor (P-TEFb). Durch diesen Faktor wird die Elongation durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II stimuliert^[74], was zur erhöhten Expression von wachstumsfördernden Genen führt^[71]. Zusätzlich agiert BRD4 auch als epigenetisches Gedächtnis in der Mitose. Bei der Zellteilung bleibt BRD4 an den Chromosomen und reaktiviert die Gentranskription direkt nach Beendigung der Mitose.^[75]

BET-Proteine sind ebenfalls regulatorische Faktoren des zentralen regulatorischen Zellwachstumsfaktors MYC.^[76] Während alle anderen BET-Proteine ubiquitär exprimiert werden, befindet sich BRDT selektiv im Hoden. BRDT ist ein hodenspezifischer Chromatin-Remodeling-Faktor, der für die Spermatogenese essenziell ist.^[77]

BET-Proteine weisen eine Reihe von wichtigen regulatorischen Eigenschaften auf. Somit können bei Dysfunktion der BET-Proteine diverse Krankheiten auftreten. BRD4 und in seltenen Fällen auch BRD3^[78] können mit NUT (*nuclear protein in testis*) Fusionsproteine bilden, welche eine äußerst aggressive Form des Epithelzellcarzinoms (*NUT midline carcinoma* (NMC))^[79] auslösen.^[80] Eine Überexpression des zellwachstumsteigernden MYC, welches durch BET-Proteine reguliert wird, wurde bei verschiedenen Leukämien und Lungenkarzinomen festgestellt.^[81]

1.4 Bekannte Inhibitoren der BET-Familie

Auf Grund vieler Krankheiten, die durch Fehlfunktion von BET-Proteinen auftreten, ist die Darstellung von Inhibitoren für BET-Proteine ein interessantes Forschungsgebiet. Schon 1990 entdeckten Wissenschaftler von Yoshimoto Pharmaceuticas (heute Mitsubishi Tanabe Pharma) die ersten BET-Inhibitoren und beschrieben deren anti-inflammatorischen und antitumoralen Eigenschaften.^[82] Aber erst in den letzten Jahren, nach der fast zeitgleichen Veröffentlichung der BET-spezifischen-Inhibitoren **JQ1**^[83] und **I-BET762**^[84] (Abb. 1.8) im Jahr 2010, wurde vermehrt eine weitere Entwicklung von Inhibitoren für Bromodomänen betrieben.

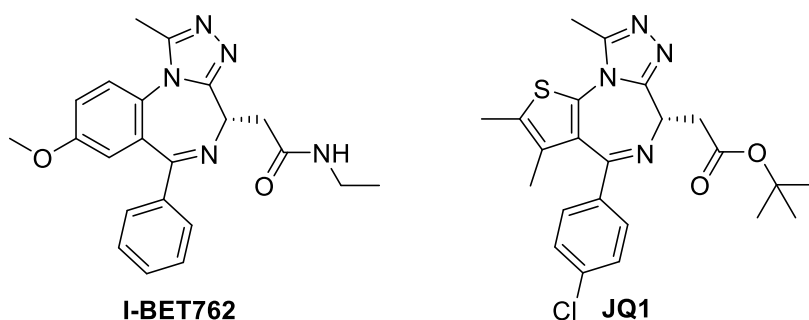


Abbildung 1.8: Methyltriazolodiazepine als BET-spezifische Inhibitoren.

Mit Hilfe des BET-spezifischen-Inhibitors **JQ1** konnten sowohl bei *NUT midline carcinoma* (NMC) als auch bei Fehlregulation von MYC Erfolge erzielt werden. In Xenograft-Mausmodellen mit NMC konnte das Wachstum des Karzinoms mit **JQ1** gestoppt werden.^[83] BET-Inhibition durch **JQ1** reguliert die MYC-Transkription herunter.^[85]

Zusätzlich zu den Krebsstudien erfolgte eine Studie zur Inhibition von BRDT durch **JQ1** und zeigte, dass der Inhibitor als nicht-hormonelles Kontrazeptivum^[86] für den Mann wirken könnte.

I-BET762 wurde zunächst auf seine Eignung als Wirkstoff gegen Sepsis untersucht.^[84] Auf Grund des guten präklinischen Profils und der Effizienz in verschiedenen Tumoren und Entzündungsreaktionen, befindet sich **I-BET762** in der klinischen Prüfung.^[87]

Bis heute ist eine große Vielfalt an kompetitiven Inhibitoren von Bromodomänen der BET-Familie entwickelt worden. Diese Inhibitoren haben die Gemeinsamkeit, dass sie ein Strukturelement enthalten, das die *N*-Acetylgruppe von KAc in den Substraten imitiert. In **I-BET762** und **JQ1** ist das KAc-Mimetikum jeweils die anellierte 1-Methyl-1,2,4-triazolgruppe. Mittlerweile sind auch weitere Substanzklassen wie 3,5-Dimethylisoxazole (z.B. **I-BET151**)^[88], 3-Methyl-3,4-dihydrochinazolinone (**PFI-1**)^[89], *N*-Acetyl-2-methyltetrahydrochinoline (**I-BET726**)^[90] und 2-Thiazolidinone^[91] (Abb.1.9) als KAc-Mimetika bekannt. Was jedoch alle bekannten BET-Inhibitoren gemeinsam haben, ist die geringe Selektivität für einzelne BET-

Familienmitglieder oder auch für die erste bzw. zweite Bromodomäne eines Proteins auf Grund der hohen Homologie der BET-Bromodomänen.

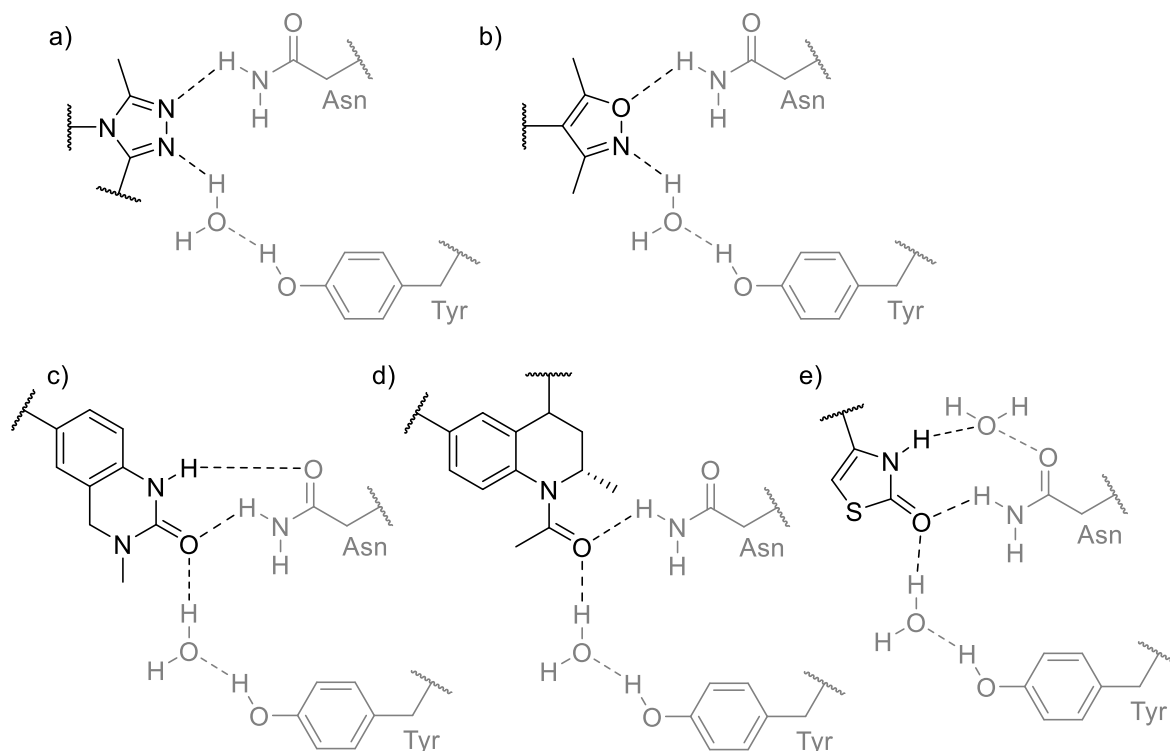


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Bromodomänen-Bindungsinteraktionen mit verschiedenen KAc-Mimetika. a) 1-Methyl-1,2,4-triazol, b) 3,5-Dimethylisoxazol, c) 3-Methyl-3,4-dihydrochinazolinon, d) *N*-Acetyl-2-methyltetrahydrochinolin, e) 2-Thiazolidinon.^[92]

Zeitgleich zu dieser Arbeit publizierten unsere Kooperationspartner S. Picaud *et al.*^[69] den ersten selektiven Inhibitor für die zweite Bromodomäne der BET-Familie (Abb. 1.10). Anhand dieses Chinazolinon-enthaltendem Inhibitors **RVX-208** wurde in einer Studie gezeigt, dass die zweite Bromodomäne vor allem die Bindung an das Chromatin beeinflusst.

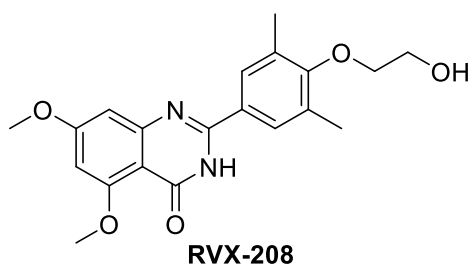


Abbildung 1.10: Für die zweite Bromodomäne der BET-Proteine selektiver Inhibitor vom Chinazolinon-Typ.

1.4.1 Triazolobenzodiazepine und Triazolobenzotriazepine als Inhibitoren der Bromodomänen der BET-Familie

In unserer Arbeitsgruppe bearbeitete M. Wrobel in seiner 2013 veröffentlichten Dissertation^[93] Triazolobenzodiazepine und Triazolobenzotriazepine als Inhibitoren von Bromodomänen der BET-Familie. Aufbauend auf den Strukturen der bekannten BET-Inhibitoren **I-BET762**^[84] (Abb. 1.7) und Alprazolam (Abb. 1.11), einem Anxiolytikum, wurden verschiedene Modifikationen zunächst an den Positionen 1 und 6 durchgeführt (Abb. 1.11).

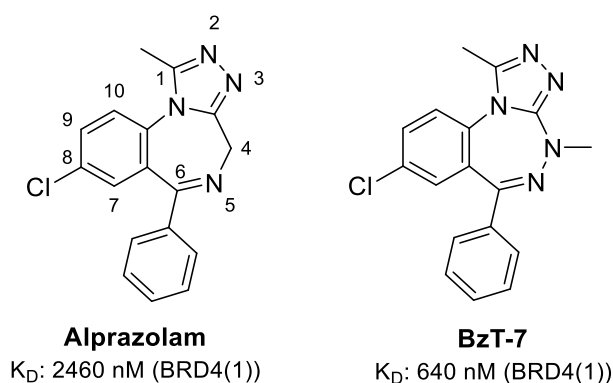


Abbildung 1.11: Leitstruktur Alprazolam und das daraus abgeleitete Triazolobenzotriazepin **BzT-7** aus der Dissertation von M. Wrobel.

Hierbei wurde das Ergebnis erlangt, dass sowohl die Methylgruppe in Position 1 des Triazolrings als auch ein Arylrest in Position 6 unersetzlich für die Inhibition der Bromodomänen sind.^[94] Eine neue Leitstruktur wurde durch ein Screening mit Hilfe des *Thermal Shift Assays* verschiedener Benzotriazepine, welche von Kollegen der Universität Greifswald zu Verfügung gestellt wurden, gefunden. Das Triazolobenzotriazepin **BzT-7** (Abb. 1.11), ähnelt dem Alprazolam stark, weist jedoch an Position 4 eine Stickstofffunktion statt einer Methyleinheit auf. Diese Verbindung **BzT-7** erwies sich als besonders affin. Der Austausch des Kohlenstoffs durch einen Stickstoff in Position 4 vereinfachte zudem die Einführung variabler Substituenten an dieser Position, ohne hierbei ein Stereozentrum zu erzeugen.

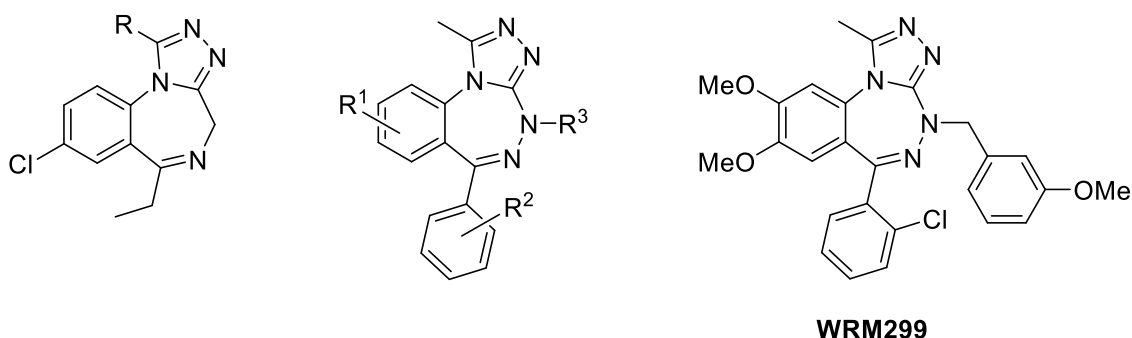


Abbildung 1.12: Strukturvariationen, welche in der Dissertation von M. Wrobel durchgeführt wurden.

Eine deutliche Steigerung der Inhibition konnte durch die Einführung von verschiedenen substituierten Benzylgruppen an N-4 anstelle der Methylgruppe erreicht werden. Der beste Substituent an der Benzylgruppe war letztendlich eine *meta*-Methoxygruppe (**WRM299**, Abb. 1.12). Auf Basis dieses neuen Grundgerüsts wurden dann Modifikationen an der Phenylgruppe in Position 6 durchgeführt. Ein *ortho*-Chlorsubstituent am 6-Phenylring führte zu einer Verringerung der Affinität, dafür aber zu einer erhöhten Selektivität. Angelehnt an **I-BET762** wurden Methoxygruppen in Position 8 und 9 eingeführt. Die Steigerung der Affinität und die Erhöhung der Selektivität der verschiedenen Inhibitoren lässt sich anhand der mit dem *Thermal Shift Assay* erhaltenen Schmelzpunktdifferenzen in Tabelle 1.1 verdeutlichen. Im *Thermal Shift Assay* geht eine hohe Affinität eines Liganden mit einer Erhöhung der Schmelztemperaturdifferenz zwischen einem Protein mit und ohne Liganden einher. Dieser *Thermal Shift Assay* erfolgte gegen sieben bis acht Mitglieder der BET-Familie (BRD2(1/2), BRD3(1/2), BRD4(1/2), sowie BRDT(1/2)) und 4 bis 5 Bromodomänen aus verschiedenen anderen Zweigen des phylogenetischen Baums (BAZ2B, CREBBP, LOC93349, PB1(5) und PCAF). Es ist zu erkennen, dass die erste Leitstruktur Alprazolam nur mäßige Temperaturdifferenzen und keine Selektivität für die jeweils zweiten Bromodomänen der BET-Familie aufweist. **BzT-7** zeigt deutlich höhere Temperaturdifferenzen und die optimierte Verbindung **WRM299** zeigt sowohl hohe Temperaturdifferenzen als auch sehr gute Selektivität für die jeweils zweiten Bromodomänen der BET-Familie.^[93]

	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	LOC93349	PB1(5)	PCAF
Alprazolam	1.9	3.3	4.1	4.6	4.8	4.1	0.8		0.0	0.6	0.0	0.3	0.0
BzT-7	2.3	6.1	5.1	7.0	4.2	6.3	1.3		-0.2	0.3	0.4	0.4	0.3
WRM299	1.7	5.9	3.7	6.0	1.8	4.7	1.4	6.3	-0.4	1.1		0.2	0.9

ΔT_m (°C)	
	<0
	0-2
	2-4
	4-6
	6-8

Tabelle 1.1: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* der Leitstrukturen Alprazolam und **BzT-7** sowie der vielversprechendsten synthetisierten Verbindung **WRM299** aus der Dissertation von M. Wrobel.^[93] Die grauen Kästchen bedeuten, dass der Inhibitor nicht gegen die entsprechende Bromodomäne gescreent wurde.

2. Themenstellung und Syntheseplanung

2.1 Themenstellung

Die Bromodomänen der BET-Familie spielen eine bedeutende Rolle in der Zellregulation^[71-72, 75] und somit auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen^[78, 83, 95], sowie der Spermatogenese^[86]. Noch sind nicht alle Mechanismen und Aufgaben der Bromodomänen aufgeklärt. Daher besteht ein großes Interesse an der Synthese neuartiger und spezifischer Inhibitoren für nur jeweils eine Bromodomäne der BET-Familie als molekulare Werkzeuge für die Grundlagenforschung.

In Kooperation unserer Arbeitsgruppe mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. S. Knapp an der Universität Oxford wurden schon einige hochaffine Bromodomänen-Inhibitoren entwickelt. Auf Basis des von M. Wrobel synthetisierten Bromodomänen-Inhibitors **WRM248** (Abb. 2.1)^[93] vom Triazolobenzotriazepin-Typ sollten in einem ersten Ansatz weitere strukturelle Modifikationen in Position 8 durchgeführt werden, um möglichst eine weitere Erhöhung der Affinität und Selektivität zu erreichen. Hier sollten vor allem aus der Nitrogruppe neue stickstoffhaltige Substituenten wie Amine und daraus abgeleitete Derivate generiert werden. Die Affinität und Selektivität der neu synthetisierten Inhibitoren wird jeweils anschließend mit Hilfe eines *Thermal Shift Assays* gemessen.

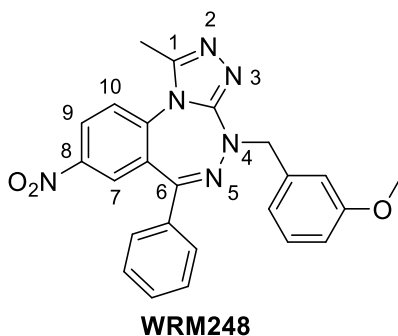


Abbildung 2.1: 8-Nitrotriazolobenzotriazepin **WRM248** von M. Wrobel^[93] als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen.

Zusätzlich sollten in Position 9 ebenfalls verschiedene funktionelle Gruppen eingeführt werden. Hierfür bot es sich an, diese Position zuerst mit einem Halogen zu substituieren, da sich über dieses mittels verschiedener Übergangsmetall-katalysierter Kupplungsreaktionen eine vielfältige Auswahl an Substituenten wie Alkyl-, Amino- oder Amidreste einbringen lässt, welche möglicherweise die Inhibitoreigenschaften stark beeinflussen könnten.

Ein weiteres Ziel war es, die prominente Leitstruktur des **JQ1**^[83] an verschiedenen Positionen zu variieren. So sollte in Position 6 zunächst ein Stickstoff eingefügt werden, um ein Stereozentrum an dieser Stelle zu vermeiden und eine einfache Modifikationsmöglichkeit an dieser Position zu schaffen (Abb. 2.2). Zudem sollte die Auswirkung der am Phenylring an C-4 *ortho*- bzw. *para*-chloresubstituierten **JQ1**-Derivate auf die Selektivität der Inhibitoren untersucht werden.

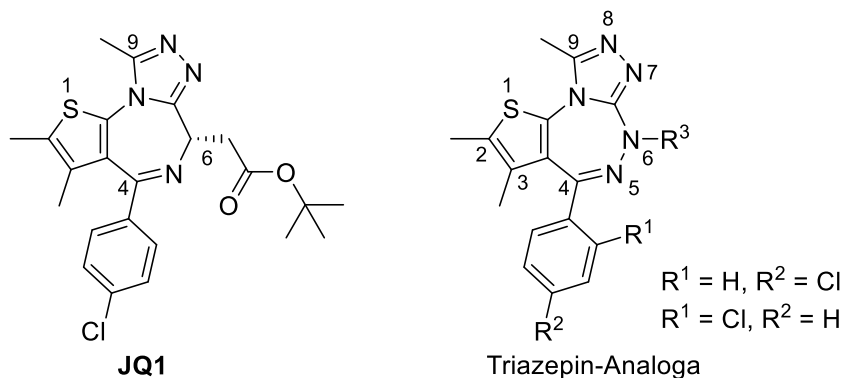


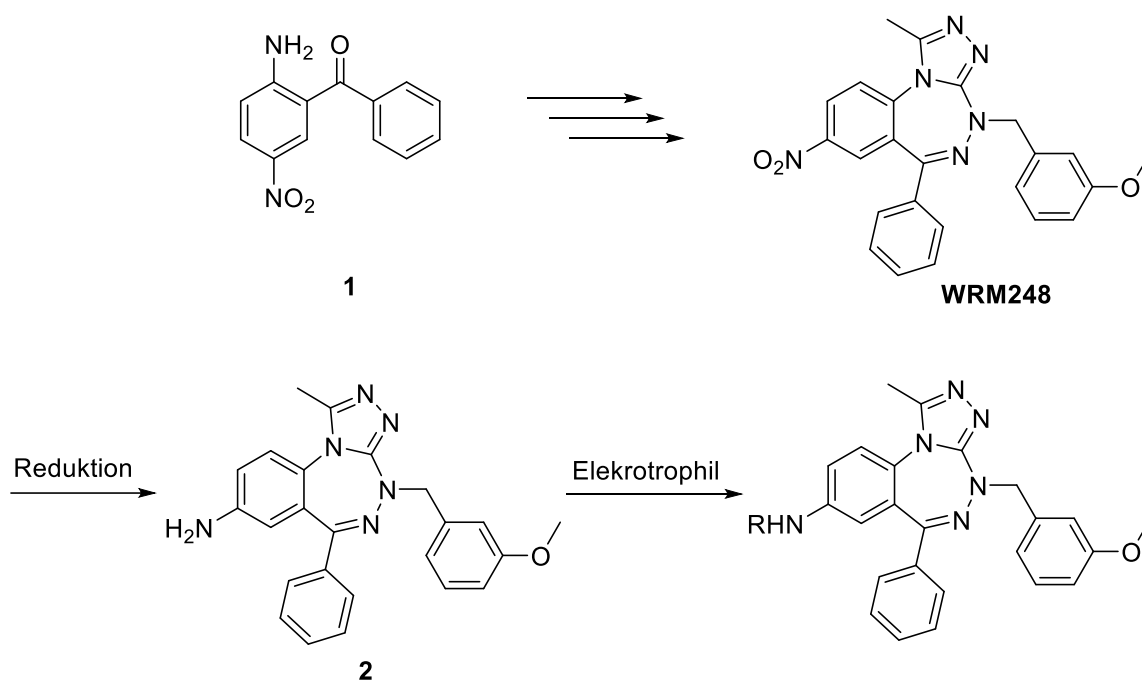
Abbildung 2.2: **JQ1** und geplante Triazepin-Analoga.

Eine Zusammenführung beider Teilthemen sollte dadurch gelingen, dass basierend auf den optimierten Substitutionsmustern am zentralen Benzenring der Triazolobenzotriazepine (Abb. 2.1) Hybride mit der prominenten Leitstruktur des **JQ1** hergestellt werden. Hierzu würde also Position 2 im **JQ1**-Analogon mit Halogen-, Amid- oder Alkylresten substituiert werden.

2.2 Syntheseplanung

2.2.1 Synthese von Triazolobenzotriazepinen mit verschiedenen Substituenten an C-8 und C-9

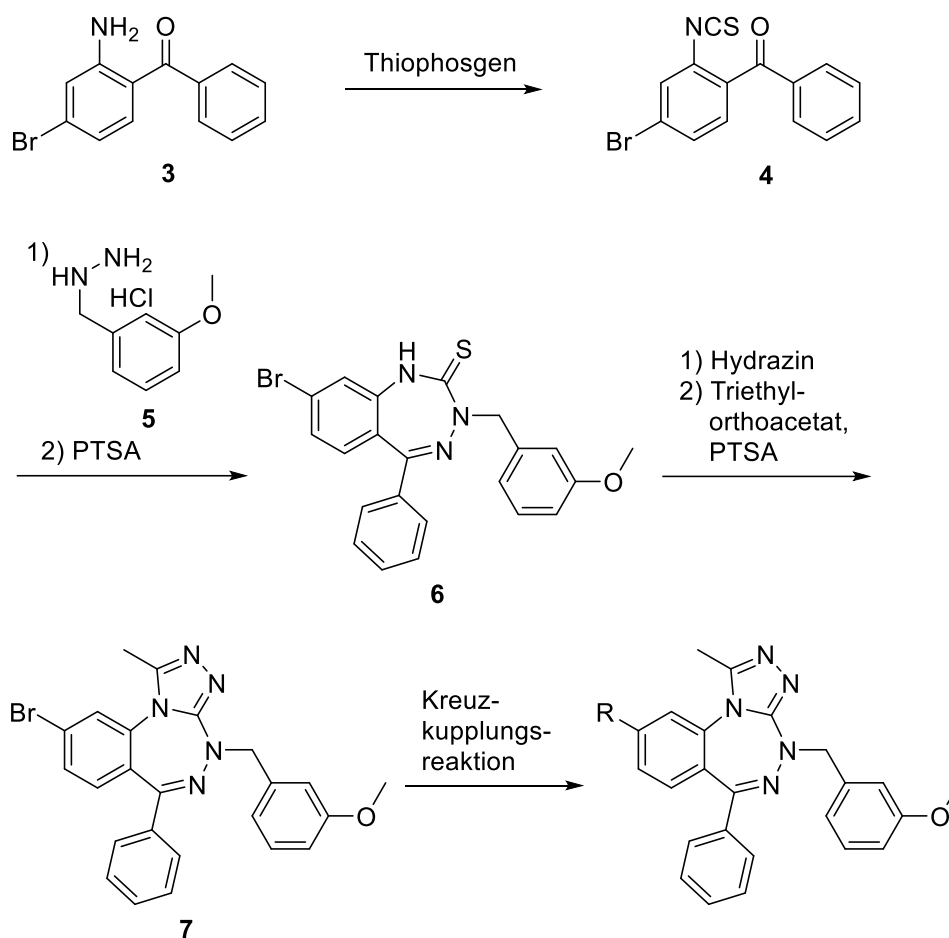
Die Synthese des 8-Nitrotriazolobenzotriazepins **WRM248** sollte nach Synthesevorschriften aus der Dissertation von M. Wrobel^[93], welche auf Arbeiten von *T. Nakamura et al.*^[96] beruhen, erfolgen. Hierzu sollte das kommerziell erhältliche 2-Amino-5-nitrobenzophenon (**1**) in einer mehrstufigen Synthese zum 8-Nitrotriazolobenzotriazepin **WRM248** umgesetzt werden (Schema 2.1). Anschließend sollte eine Reduktion der Nitrogruppe zum Amin erfolgen, um nachfolgend das freie Amin **2** mit verschiedenen Substituenten modifizieren zu können.



Schema 2.1: Geplante Synthese des 8-Aminotriazolobenzotriazepins **2** und weitere funktionalisierte Derivate.

Die Synthese des 9-Bromtriazolobenzotriazepins **7** sollte nach einer prinzipiell gleichen Synthesestrategie (Schema 2.2) erfolgen. Auch hier sollte zunächst das Aminobenzophenon **3** mit Thiophosgen zum Isothiocyanat **4** in Anlehnung an eine Methode von P. Richter *et al.*^[97] umgesetzt werden. Durch Einbau des 3-Methoxybenzylhydrazins (**5**) und nachfolgende Behandlung mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat sollte das Benzotriazepinthion **6** erhalten werden.^[98] Darauf folgende Kondensation mit Hydrazin und Cyclisierung mit Triethylorthoacetat^[99] sollte das 9-Bromtriazolobenzotriazepin **7** liefern. Anschließend sollten

aus der Bromverbindung **7** über Kreuzkupplungsreaktionen wie Suzuki-, Ullmann- oder Buchwald-Hartwig-Reaktionen neue Analoga mit Alkyl-, Amino- oder Amidsubstituenten erhalten werden.

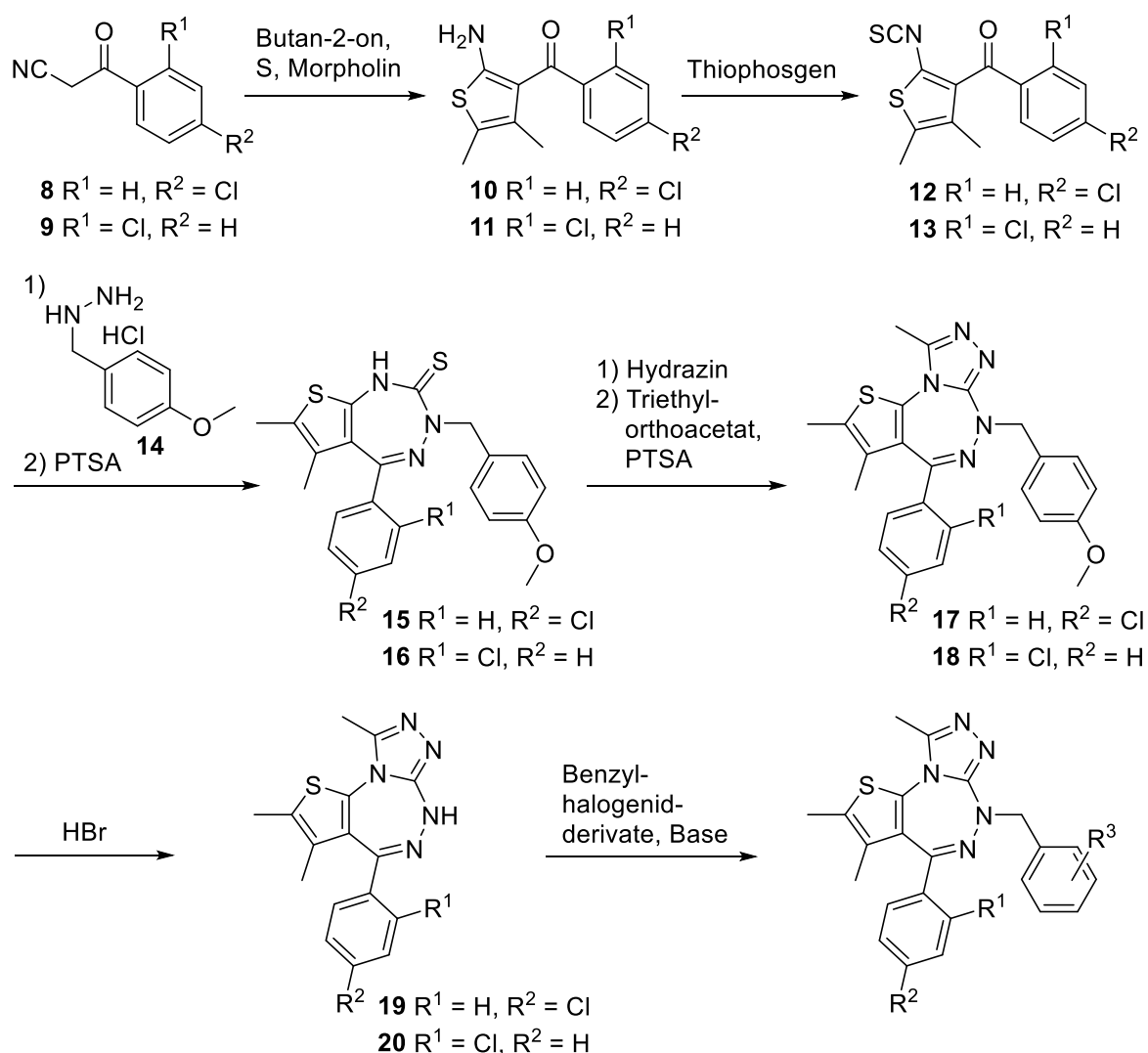


Schema 2.2: Geplante Synthese des 9-Bromtriazolobenzotriazepins **7** als Intermediat für Übergangsmetall-katalysierte Kreuzkupplungsreaktionen.

2.2.2 Synthese der Triazolothienotriazepine

Um vergleichen zu können, ob eine *ortho*- oder eine *para*-Chlorsubstitution des 4-Phenylrings des JQ1-Analogons die Selektivität für die zweite Bromodomäne erhöht, sollten zwei analoge Reihen von JQ1-Analoga angefertigt werden. Zugleich sollte in Position 6 der Benzylrest mit höchster Affinität gesucht werden.

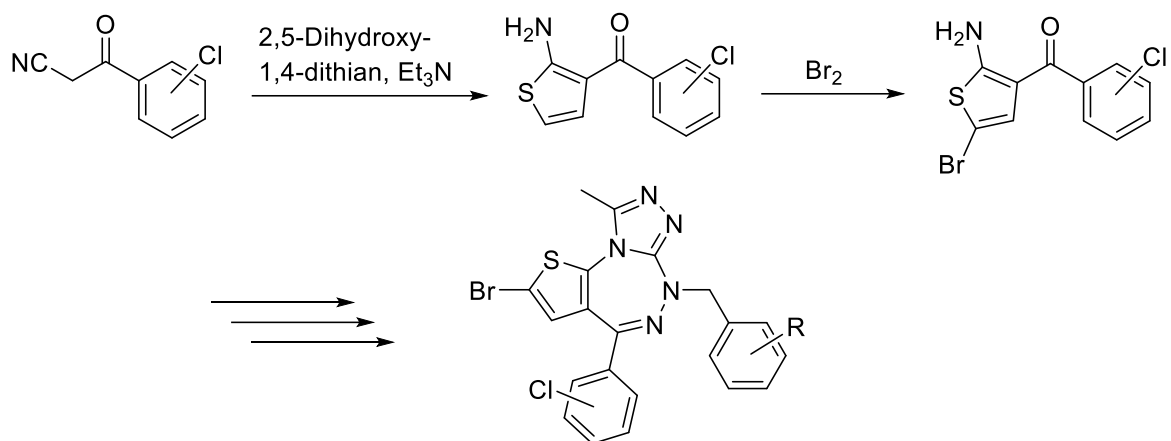
Die Synthesestrategie ist angelehnt an die Synthese der Triazolobenzotriazepine (Schema 2.2). Für die Synthese der benötigten (2-Aminothiophen-3-yl)(phenyl)methanone **10** bzw. **11** bot sich eine Gewald-Reaktion an, die es ermöglicht, 2-Amino-3-acylthiophene aus einfachen Bausteinen wie Benzoylacetoneitrilen **8** bzw. **9**, Butan-2-on und elementarem Schwefel aufzubauen (Schema 2.3).^[83] Unter Einbau von 4-Methoxybenzylhydrazin (**14**) sollten die Thienotriazepinthione **15** bzw. **16** erhalten werden. Die Triazolringe sollten durch Kondensation mit Hydrazin und Cyclisierung mit Triethylorthoacetat aufgebaut werden. Von den Triazolothienotriazepinen **17** bzw. **18** sollten sich die *para*-Methoxybenzylschutzgruppe mit Hilfe von Bromwasserstoff in Eisessig entfernen lassen. Durch nachfolgende *N*-Alkylierung mit geeignet substituierten Benzylhalogeniden sollten Modifikationen des Benzylrings an Position N-6 ermöglicht werden.



Schema 2.3: Geplante Synthese variabel substituierter Triazolothienotriazepine.

Durch anschließende Testung mit *Thermal Shift Assays* sollte der Substituent mit der höchsten Affinität der Triazolothienotriazepine sowie die beste Substitutionsstruktur des Benzylrestes an Position 6 der Triazolothienotriazepine ermittelt werden. Die Ergebnisse daraus sollten dann in einem kombinierten Molekül eingesetzt werden, um einen sehr selektiven und hochaffinen Bromodomänen-Inhibitor zu erhalten.

Um eine Modifikationsmöglichkeit an Position 2 des Thiophenring zu erhalten, sollte zunächst eine modifizierte Gewald-Reaktion^[100] zur Synthese eines an C-4 und C-5 unsubstituierten 2-Aminothiophens durchgeführt werden. Im Anschluss sollte ein Bromsubstituent an C-5 eingeführt werden (Schema 2.4). Nach Aufbau des Triazolothienotriazepin-Gerüsts, sollte dann der Brom-Substituent durch geeignete Folgereaktionen in andere interessante Substituenten zu überführen sein.



Schema 2.4: Geplante Synthese des kombinierten Moleküls und daraus resultierendes Triazolothienotriazepin als Baustein für weitere Funktionalisierungen an C-2.

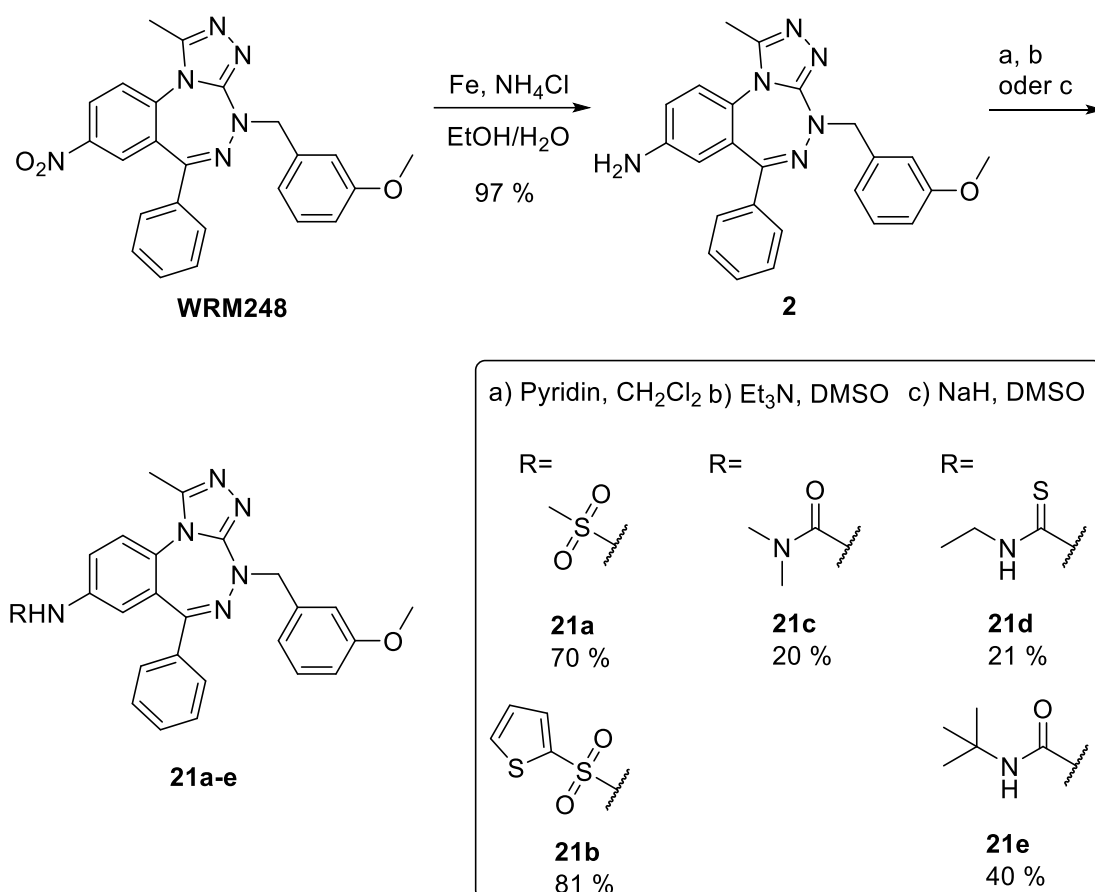
3. Ergebnisse und Diskussion

Aufbauend auf den Ergebnissen der Testungen, die M. Wrobel in seiner Dissertation^[93] veröffentlichte, wurden verschiedene Triazolobenzotriazepine sowie Hybridstrukturen mit **JQ1**^[83] innerhalb dieser Dissertation weiter untersucht. M. Wrobel arbeitete in seiner Dissertation an Triazolobenzodiazepinen und Triazolobenzotriazepinen als Bromodomänen-Inhibitoren der BET-Familie und erzielte mit geeignet substituierten Triazolobenzotriazepinen bereits verbesserte Affinität und Selektivität.

Auf Basis dieser Ergebnisse sollten weitere Untersuchungen an der Inhibitorenklasse der Triazolobenzotriazepine, bevorzugt mit dem von M. Wrobel optimierten *meta*-Methoxybenzylrest an Position 4, aber nun mit neuen Substituenten in den Positionen 8 und 9 untersucht werden.

3.1 Synthesen der 8-Aminotriazolobenzotriazepinderivate

Das erste Projekt befasste sich mit der Synthese von Triazolobenzotriazepinen mit neuen, vor allem stickstoffhaltigen Substituenten an Position 8. Als Vorstufe hierzu wurde nach einem schon bestehenden Syntheseplan aus M. Wrobels Dissertation^[93], basierend auf Arbeiten von T. Nakamura *et al.*^[96], das 8-Nitrotriazolobenzotriazepin **WRM248** hergestellt. Anschließend wurde die Nitrogruppe mit einer schonenden Methode, angelehnt an ein US-Patent von S. Bell *et al.*^[101], mit Eisenpulver und Ammoniumchlorid in einem Ethanol/Wasser-Gemisch in fast quantitativer Ausbeute zum primären Amin reduziert. Durch Funktionalisierungen unter Standardbedingungen konnten darauffolgend verschiedene Substituenten eingeführt werden. So entstanden unter Verwendung von Methansulfonylchlorid bzw. Thiophen-2-sulfonylchlorid in Gegenwart der Hilfsbase Pyridin die entsprechenden Sulfonamide **21a** und **21b** in guten Ausbeuten von 70 % bzw. 81 %. Mit Hilfe von *N,N*-Dimethylcarbonylchlorid und Triethylamin wurde in mäßiger Ausbeute der unsymmetrische Harnstoff **21c** synthetisiert. Unter Verwendung von Iso(thio)cyanaten wie Ethylisothiocyanat und *tert*-Butylisocyanat wurden nach Deprotonierung mit Natriumhydrid die entsprechenden (Thio-)Harnstoffe **21d** und **21e** in mäßigen Ausbeuten von 21 % bzw. 40 % hergestellt (Schema 3.1).



Schema 3.1: Synthese der Triazolobenzotriazepine mit funktionalisierter Aminogruppe in Position 8.

3.1.1 Ergebnisse und Diskussion des Screenings der funktionalisierten 8-Aminotriazolobenzotriazepine

Die an Position 8 mit stickstoffhaltigen Gruppen funktionalisierten Triazolobenzotriazepine wurden am SGC der Universität Oxford mit einem *Thermal Shift Assay* untersucht. Hierbei wurde an jeweils acht Bromodomänen der BET-Familie (BRD2(1/2), BRD3(1/2), BRD4(1/2), und BRDT(1/2)) gescreent. Zudem wurde noch an vier bis fünf weiteren Bromodomänen (BAZ2B, CREBBP, LOC93349, PB1(5) und PCAF) getestet, die nicht der BET-Familie angehören, sondern jeweils aus unterschiedlichen Zweigen des phylogenetischen Baums der Bromodomänen stammen.

Zum Vergleich wird in Tabelle 3.1 auch das von M. Wrobel synthetisierte 8-Nitrotriazolobenzotriazepin **WRM248**^[93] aufgeführt.

In dieser Testreihe wurden für alle Verbindungen signifikante Temperaturshifts (mehr als 4 °C) gemessen. Im Vergleich zum 8-Nitrotriazolobenzotriazepin **WRM248** zeigten aber die

Sulfonamide **21a** und **21b** sowie der Thioharnstoff **21d** deutlich kleinere Temperaturdifferenzen. Leicht verbesserte Temperaturdifferenzen fanden sich bei dem freien Amin **2** und dem *N,N*-Dimethylharnstoff **21c**, während bei dem *tert*-Butylharnstoff **21e** spektakulär hohe Temperaturdifferenzen gemessen wurden. Bei allen Testsubstanzen ist sehr gut zu erkennen, dass es keine signifikanten Kreuzreaktivitäten zu den Bromodomänen außerhalb der BET-Familie gibt.

	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	LOC93349	PB1(5)	PCAF
WRM248	2.3	6.0	3.7	5.8	5.2	7.0	1.5	5.6	0.2	-0.2	0.4	0.4	0.4
2	3.2	4.4	4.6	6.1	5.6	7.9	1.7	7.5	-2.3	-4.5		-3.1	-0.8
21a	3.5	2.8	4.4	5.0	6.0	5.3	2.0	5.6	0.1	1.0		-0.2	0.4
21b	2.7	2.4	3.0	3.6	4.7	3.7	1.5	2.8	0.3	2.9		0.1	0.1
21c	3.5	3.0	5.0	6.9	6.7	7.5	2.3	8.2	-0.1	1.3		-0.1	0.0
21d	2.1	2.3	2.4	3.8	4.1	3.6	0.7	2.8	0.0	-0.3		0.0	-0.5
21e	6.7	3.8	8.1	9.5	10.6	10.4	5.5	11.5	0.6	2.2		0.7	0.6

ΔT_m (°C)	
	<0
	0-2
	2-4
	4-6
	6-8
	>8

Tabelle 3.1: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* für die 8-Aminotriazolobenzotriazepin-Derivate. Die grauen Kästchen bedeuten, dass der Inhibitor nicht gegen die entsprechende Bromodomäne gescreent wurde.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass stark polare Reste mit mehreren möglichen Wasserstoffbrückendonatoren, wie Harnstoffe, einen positiven Effekt auf die Affinität der Inhibitoren für die Bromodomänen der BET-Familie haben. Die Sulfonamide besitzen im Vergleich zu den Harnstoffen weniger NH-Funktionen und somit potentielle Wasserstoffbrückendonatoren, dafür jedoch viele Wasserstoffbrückenakzeptoren in Form von Sauerstoffatomen. Dies scheint die Affinität der Inhibitoren jedoch nicht zu steigern.

Auf Grund der hervorragenden Testergebnisse des *tert*-Butyltriazolotriazepinharnstoffs **21e** wurde dieser von unseren Kooperationspartnern am SGC der Universität Oxford mit BRD4(1) co-kristallisiert (Abb. 3.1).

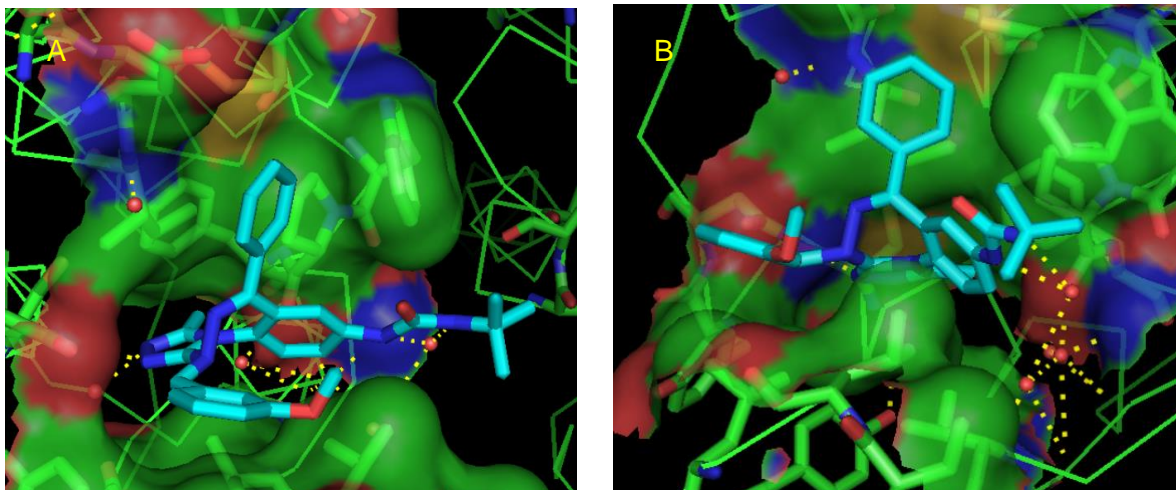


Abbildung 3.1: Co-Kristallstruktur des *tert*-Butylharnstoffs **21e** mit der BET-Bromodomäne BRD4(1). Die eingelagerten Wassermoleküle werden als rote Kugeln dargestellt.

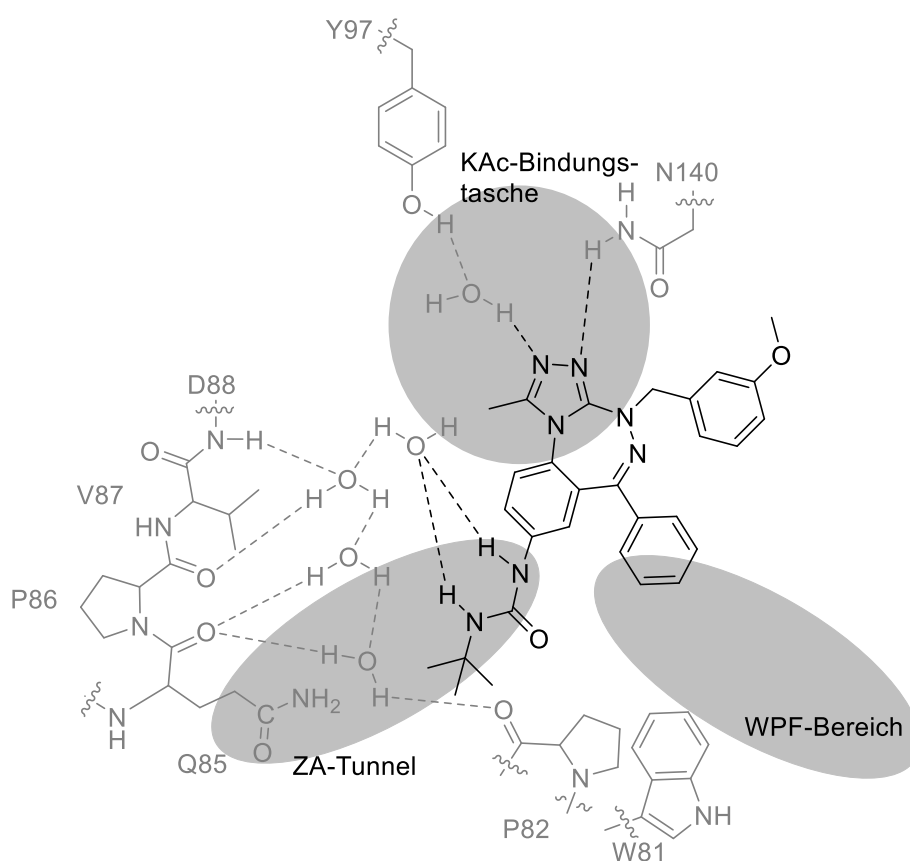


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Interaktionen des *tert*-Butylharnstoffs **21e** in BRD4(1), angelehnt an eine Darstellung von D. S. Hewings *et al.*^[54] und D. Gallenkamp *et al.*^[92]

Anhand der Kristallstruktur konnten konkrete Aussagen zum Bindungsmodus getroffen werden. Der Triazolring reicht weit in die Bindungstasche für den *N*-acetylierten Lysinrest

hinein. Der Stickstoff an Position 2 des Triazolrings interagiert über ein Wassermolekül mit einem Tyrosin des Proteins (Abb. 3.1 und 3.2) und der andere Stickstoff an Position 3 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum hoch konservierten Asparagin 140 aus. Dieses Bindungsmuster wurde auch schon bei den Triazolringen des **JQ1** und des **I-BET762** beobachtet (Abb. 3.3).^[54]

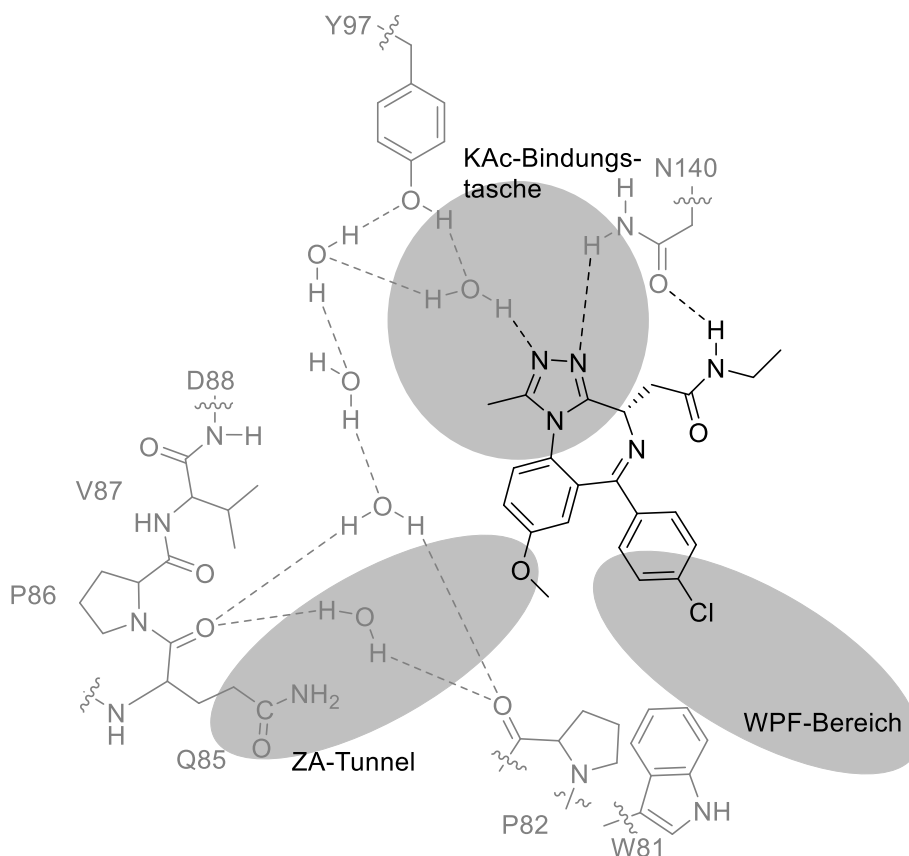
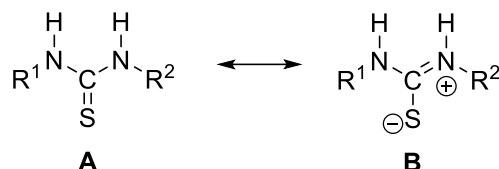


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Interaktionen des Inhibitors **I-BET762** in BRD4(1).^[54, 92]

Ebenfalls ähnlich wie bei **JQ1** und **I-BET762** ragt der 6-Phenylrest in den hydrophoben WPF-Bereich hinein. Bei beiden Kristallstrukturen lassen sich im ZA-Tunnel die vier Kristallwassermoleküle erkennen. Im Fall von **21e** interagieren beide NH-Funktionen des *tert*-Butylharnstoffrestes an C-8 als Wasserstoffbrückendonatoren und binden ein Wassermolekül. Dieses Wassermolekül geht über ein weiteres Wassermolekül mit dem ZA-Tunnel Wechselwirkungen ein. Der *tert*-Butylrest ragt dabei schon aus der Bindungstasche heraus. Die geringere Affinität des *N,N*-dimethylierten Harnstoffs **21c** könnte darauf zurückzuführen sein, dass für die Wasserstoffbrückenbildung nur noch eine NH-Funktion zur Verfügung steht. Der Ethylthioharnstoff **21d** weist erstaunlicherweise eine noch geringere Affinität als die beiden anderen Harnstoffe **21c** und **21e** auf. Die höhere NH-Azidität von Thioharnstoffen im Vergleich zu Harnstoffen ($pK_s = 21.0$ bzw. 26.9 gemessen in DMSO^[102]) auf Grund des höheren C-N

Doppelbindungscharakters der Thioharnstoffe^[103], würde einen gegenteiligen Befund erwarten lassen.

Der Doppelbindungscharakter der C-N Bindung ist bei Thioharnstoffen erhöht, da die Bildung der π -Bindung des Schwefels zum Kohlenstoff gering ist (Schema 3.2).^[103] Die Erniedrigung der Elektronendichte am Stickstoff und die dadurch verbundene Erhöhung der NH-Azidität beim Thioharnstoff bewirkt, dass dieser der stärkere Wasserstoffbrückendonator ist und somit an sich stärkere Wasserstoffbrücken ausbildet.



Schema 3.2: Bei Thioharnstoffen kommt es zu einer stärkeren Beteiligung der rechten Grenzformel **B** und somit zur Erhöhung des Doppelbindungscharakters und der NH-Azidität.^[103]

Eine Möglichkeit, die geringere Affinität des Thioharnstoffs **21d** im Vergleich zum *tert*-Butylharnstoffs **21e** zu erklären, liefert eine Veröffentlichung von C. Roussel *et al.*^[104], in welcher die Konformationen von Harnstoffen und Thioharnstoffen beschrieben werden. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass Harnstoffe bevorzugt in der Z,Z-Konformation vorliegen, Thioharnstoffe hingegen häufig auch in der Z,E-Konformation (Abb. 3.4). Um diese Z/E-Konformation in die affinitätserhöhende Z/Z-Konformation zu überführen, ist ein Energieaufwand von etwa 9 kcal/mol notwendig.^[105] Dieser Energieaufwand für die Überführung des Thioharnstoffs in die für die Ausbildung der zwei Wasserstoffbrücken erforderliche Konformation resultiert in einem deutlichen Verlust der Affinität zum Protein. Dass die Thioharnstoffe in Vergleich zu den Harnstoffen in verschiedenen Konformeren vorliegen, lässt sich auch anhand der NMR-Daten der beiden synthetisierten Verbindungen sehen. So zeigt der *tert*-Butylharnstoff **21e** in NMR-Spektrum keine Rotamere, der Ethylthioharnstoff **21d** jedoch schon. Im NMR-Spektrum der Verbindung **21d** liegen zwei Rotamere in einem Verhältnis von 80:20 vor.



Abbildung 3.4: Konformationen des Thioharnstoffs.

Zusammengefasst lässt sich daraus schließen, dass der neu entwickelte Inhibitor **21e** die gleichen wesentlichen Interaktionen mit dem Protein zeigt wie die Leitstrukturen **I-BET762** und **JQ1**. Allerdings bildet der Harnstoff von **21e** zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen über ein Wassermolekül in den ZA-Tunnel aus. Diese Wasserstoffbrücken führen zu einer deutlichen Erhöhung der Affinität von **21e** zur Bromodomäne.

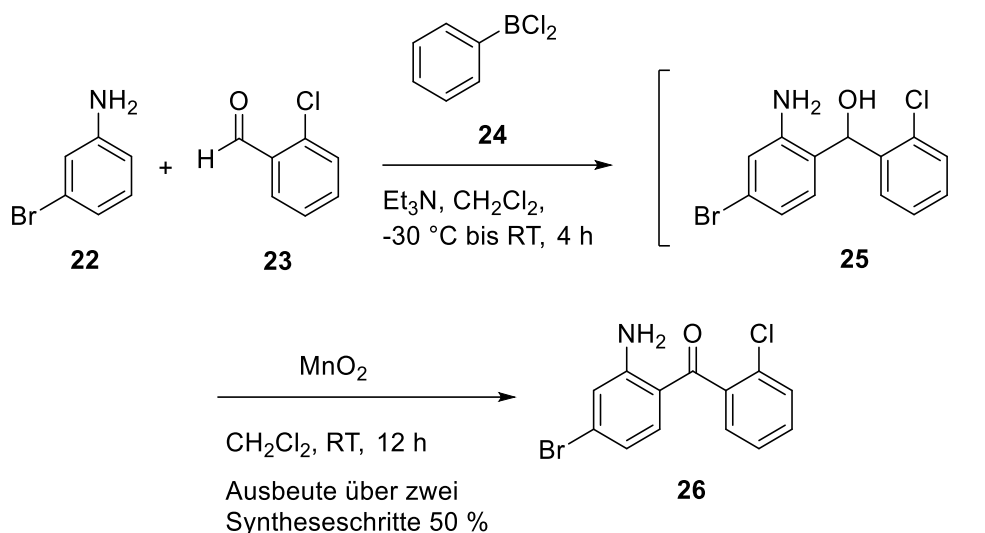
3.2 Synthese von Triazolobenzotriazepinen mit verschiedenen Modifikationen an C-9

Ermutigt durch den durchschlagenden Erfolg der Einführung einer Harnstoffgruppe an C-8 des Triazolobenzotriazepin-Grundkörpers sollte der Einfluss von Substituenten an der direkt benachbarten Position C-9 untersucht werden. Auch hier standen polare stickstoffhaltige Reste im Zentrum des Interesses - sei es direkt über das Stickstoffatom mit C-9 verknüpft oder über einen Spacer.

Angelehnt an Vorschriften von T. Nakamura *et al.*^[96] sollte als zentrales Intermediat das 9-Bromtriazolobenzotriazepin **30** dargestellt werden, aus welchem mit verschiedenen Kreuzkupplungsreaktionen eine große Variation an 9-substituierten Analoga herzustellen sein sollte. Da sich anhand der Daten zu den zeitgleich bearbeiteten Triazolothienotriazepinen (siehe Kapitel 3.3.4) sowie den bekannten Daten aus der Dissertation^[93] von M. Wrobel abzeichnete, dass sich ein *ortho*-Chlorsubstituent an der 6-Phenylgruppe positiv auf die Selektivität der Inhibitoren für die jeweils zweiten Bromodomänen (BD2) auswirken sollte, wurde zuerst ein Intermediat **30** (Schema 3.4) formuliert, welches an der C-6 Position einen *ortho*-chlorsubstituierten Phenylrest aufweist.

3.2.1 Synthese des Aminobenzophenons

Um dieses Zielmolekül **30** zu erreichen, musste vorerst das geeignet substituierte Aminobenzophenon (2-Amino-4-bromphenyl)(2-chlorphenyl)methanon (**26**) hergestellt werden (Schema 3.3). Angelehnt an eine Methode von J.-J. Liu *et al.*^[106] wird hierzu zunächst 3-Bromanilin (**22**) unter basischen Bedingungen mit einem leichten Überschuss an Dichlorphenylboran (**24**) umgesetzt, wobei ein Boran-Amin-Addukt entsteht. Dieses bildet bei Zugabe einer äquimolaren Menge an 2-Chlorbenzaldehyd (**23**) einen sechsgliedrigen Übergangszustand durch Koordination des Carbonylsauerstoffs. Der Aldehyd **23** wird in *ortho*-Position zur Aminogruppe an das Anilin **22** dirigiert. Nach basischer Aufarbeitung entsteht als nicht isoliertes Zwischenprodukt vorerst ein sekundärer Alkohol **25**, welcher umgehend mit Hilfe von Braunstein zum Keton **26** oxidiert wird. Das 2-Aminobenzophenon **26** wird auf diese Weise in einer guten Ausbeute von 50 % über diese zwei Syntheseschritte erhalten.



Schema 3.3: Boranvermittelte Synthese von (2-Amino-4-bromphenyl)(2-chlorphenyl)methanon (**26**).

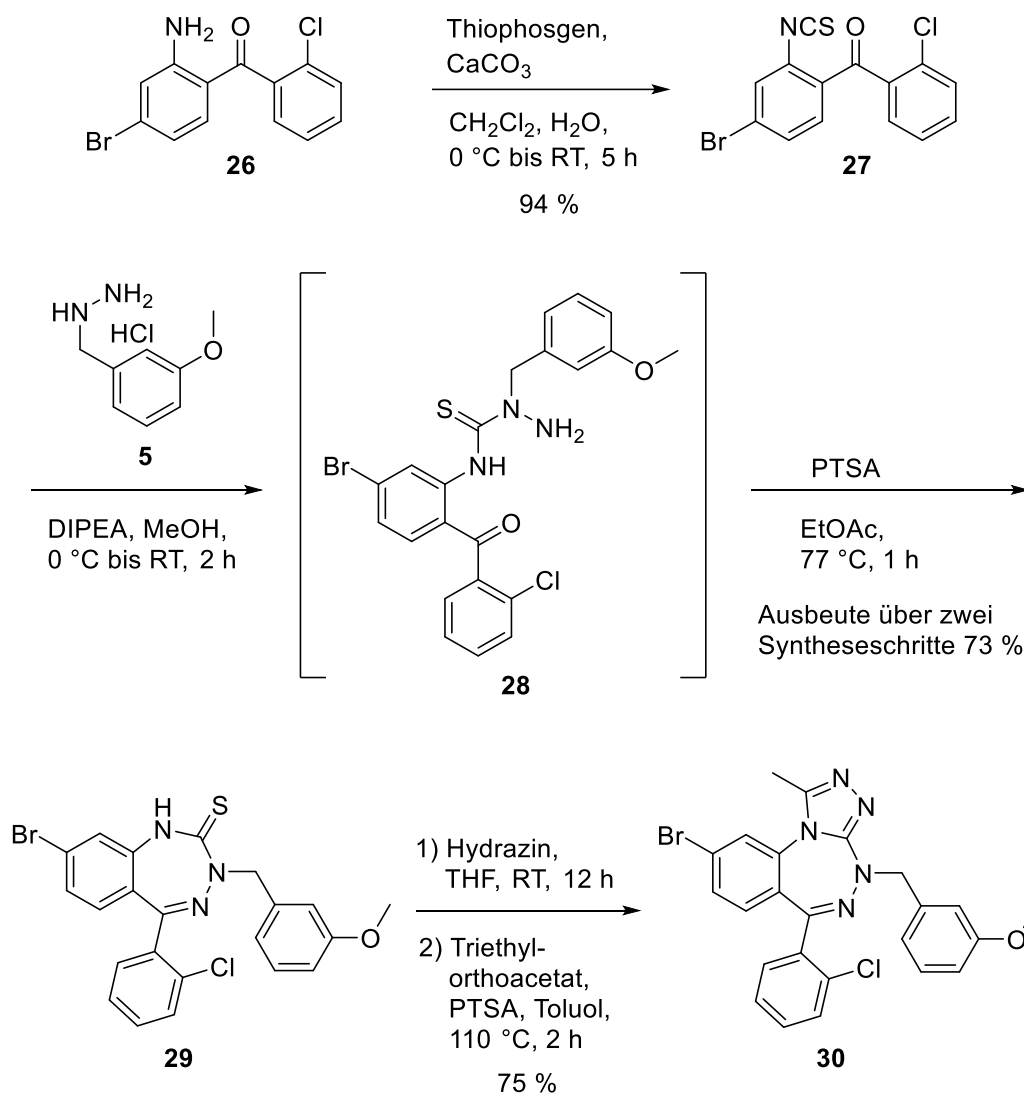
3.2.2 Synthese des 9-Bromtriazolobenzotriazepins **30**

Angelehnt an eine Vorschrift von P. Richter *et al.*^[97] wurde das Aminobenzophenon **26** mit einem Überschuss an Thiophosgen zum Isothiocyanat **27** mit sehr guter Ausbeute von 94 % umgesetzt (Schema 3.4).

Das für die folgende Synthese des Benzotriazepinthions **29** benötigte 3-Methoxybenzylhydrazin (**5**), kann nach einer Vorschrift von M. Wrobel^[93] hergestellt werden. Hierbei werden zunächst äquimolare Mengen von *tert*-Butoxycarbonylhydrazid und 3-Methoxybenzaldehyd in Ethanol unter Rückfluss zum Hydrazon kondensieren. Dieses kann mit Boran-Dimethylsulfid zum Hydrazid reduziert werden und eine anschließende Entschützung der Boc-Schutzgruppe mit Salzsäure führt zum gewünschten Produkt **5**.

Angelehnt an Methoden von T. Nakamura *et al.*^[96] wird das 9-Bromtriazolobenzotriazepin **30** in fünf Syntheseschritten erhalten. Durch Reaktion des Isothiocyanats **27** mit einem leichten Überschusses an 3-Methoxybenzylhydrazin (**5**) und nachfolgende Behandlung mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zur Cyclisierung des nicht isolierten, offenkettigen Zwischenprodukts **28**, ergibt sich das Benzotriazepinthion **29** in einer guten Ausbeute von 73 %. Darauf folgende Kondensation des Benzotriazepinthions **29** mit Hydrazin und Cyclisierung mit Triethylorthoacetat^[99] und einer katalytischen Menge an *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat liefert das 9-Bromtriazolobenzotriazepin **30** in einer guten Ausbeute von 75 %.

Anschließend sollten aus der Bromverbindung **30** über Kreuzkupplungsreaktionen wie Suzuki-, Ullmann- oder Buchwald-Hartwig-Reaktionen neue Analoga mit Substituenten wie z. B. Alkyl-, Amino- oder Amidresten erhalten werden.



Schema 3.4: Synthese des 9-Bromtriazolobenzotriazepins **30** ausgehend von dem Aminobenzophenon **26**.

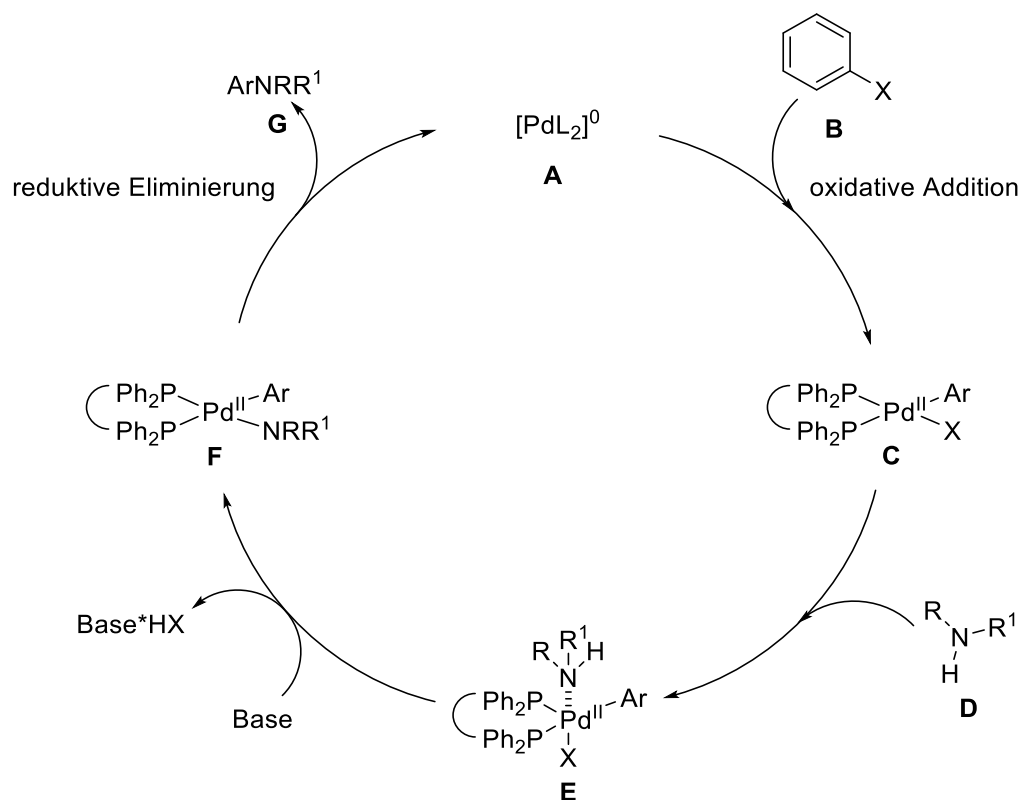
3.2.3 Knüpfung von C-N-Bindungen mittels Übergangsmetall-katalysierter Kreuzkupplungen an C-9

Da in dem oben beschriebenen Teilprojekt (Kapitel 3.1.1) funktionalisierte 8-Aminotriazolobenzotriazepine, wie z. B. der *N,N*-Dimethylharnstoff **21c** und der *tert*-Butylharnstoff **21e**, die besten Testergebnisse, im *Thermal Shift Assay* erreichten und sogar M. Wrobels Inhibitoren übertrafen, sollten nun vergleichbare Verbindungen mit Amino- bzw. Harnstoffgruppen an der C-9 Position synthetisiert werden. So sollte festgestellt werden, ob mit stellungsisomeren Verbindungen gute oder sogar höhere Affinitäten für BET-Bromodomänen erreicht werden können. Naheliegend war die Einführung von Stickstofffunktionen an C-9 des Triazolobenzotriazepins mit Hilfe einer Buchwald-Hartwig-Kupplung.

3.2.3.1 Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung an C-9

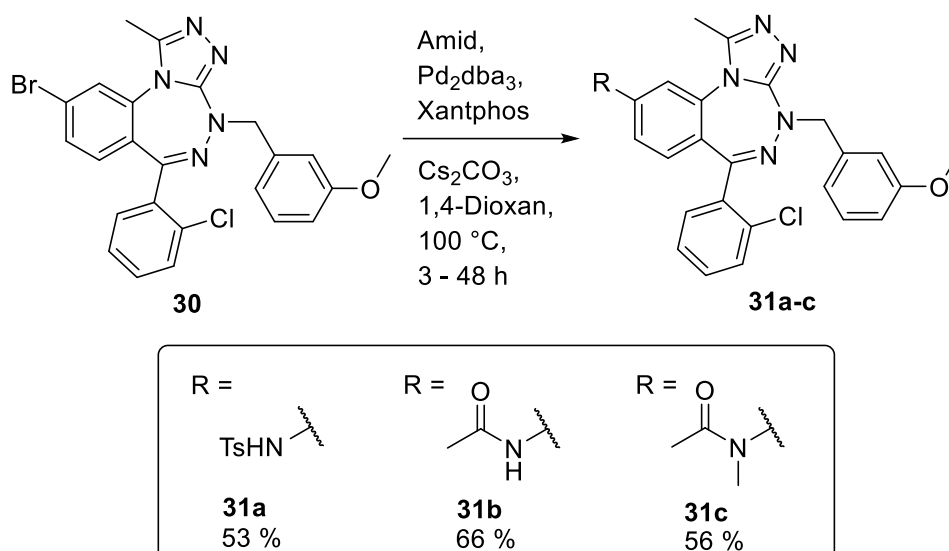
Unter Verwendung einer Kupplungsmethode von J. Yin *et al.*^[107] sollte ein geschütztes Amin mittels Tosylamid an C-9 des 9-Bromtriazolobenzotriazepins **30** unter Buchwald-Hartwig-Bedingungen eingeführt werden können. Die Autoren beschreiben eine Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsreaktion zwischen Arylbromiden und verschiedenen Amiden in Gegenwart von 4 mol % Pd(0)-Katalysator, zugegeben als Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0), und 6 mol % Xanthphos-Ligand unter basischen Bedingungen. Diese Kreuzkupplungsvariante stellt eine generelle Amidierungsmethode dar, um primäre und sekundäre Amide, Sulfonamide und auch Carbamate in 1,4-Dioxan oder Tetrahydrofuran mit Arylbromiden, -triflaten oder -iodiden zu koppeln. Das von M. Kraneburg *et al.*^[108] erstmalig 1995 beschriebene Xanthphos wurde von J. Yin *et al.*^[107] als optimaler Ligand identifiziert.

Der Mechanismus dieser Kreuzkupplung verläuft über einen Additions-Eliminierungs-Mechanismus (Schema 3.5).^[109] So folgt auf die oxidative Addition des Arylhalogenids **B** an den Katalysator **A**, wobei Pd(0) zu Pd(II) oxidiert wird, eine Komplexbildung des Amids **D**. Daraufhin wird eine neue σ -Bindung des Palladiums zum Amid im Komplex **F** basenvermittelt gebildet. Durch eine reduktive Eliminierung entsteht das gewünschte C-N-verknüpfte Produkt **G** unter Regenerierung des Palladium-Katalysators auf die Oxidationsstufe null.



Schema 3.5: Mechanismus der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung.

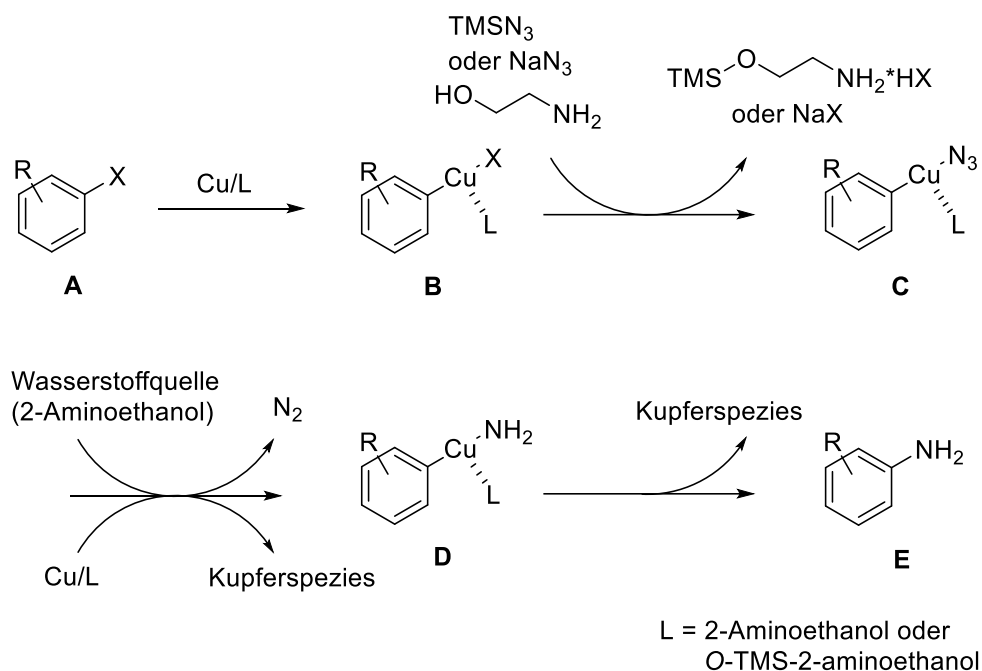
Tatsächlich konnte mit Hilfe dieser Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplungsmethode Tosylamid mit dem 9-Bromtriazolobenzotriazepinen **30** in einer moderaten Ausbeute von 53 % zum Tosylgeschützten Amin **31a** umgesetzt werden (Schema 3.6). Auch weitere Umsetzungen des 9-Bromtriazolobenzotriazepins **30** mit dem primären Acetamid zum Benzotriazolotriazepin-9-ylacetamid **31b** und dem sekundären *N*-Methylacetamid zum Benzotriazolotriazepin-9-yl-*N*-methylacetamid **31c** waren mit 56 - 66 % Ausbeute zufriedenstellend. Da die Ausbeuten der beiden Amide **31a** und **31b** über die Buchwald-Hartwig-Kupplung nicht optimal waren, um darauf mehrere Folgeschritte aufzubauen, wurden mit diesen Verbindungen keine Hydrolyseversuche zum gewünschten primären Amin **32** (Schema 3.8) unternommen, sondern gleich nach einer ergiebigen Möglichkeit gesucht ein ungeschütztes, primäres Amin an C-9 direkt zu erzeugen.



Schema 3.6: Synthese verschiedener Amide mit Hilfe der Buchwald-Hartwig-Kreuzkupplung.

3.2.3.2 Direkte Aminierung an C-9

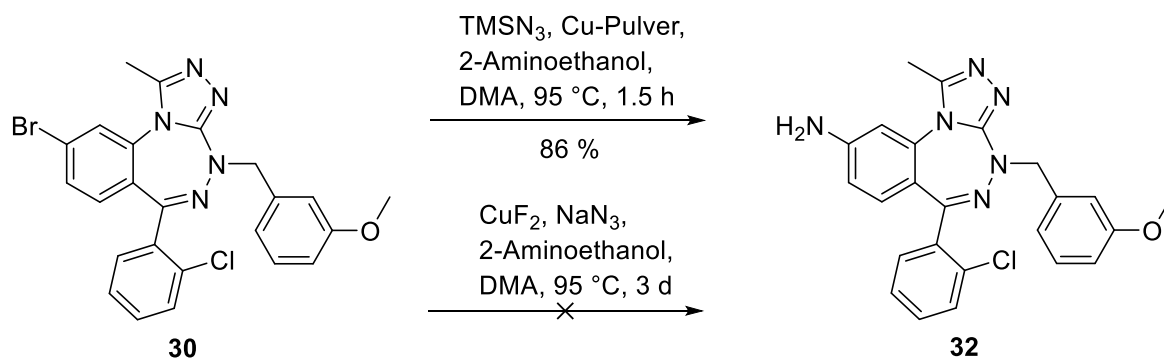
Um in höheren Ausbeuten das gewünschte primäre Amin **32** (Schema 3.8) darzustellen, wurde nach eleganteren Möglichkeiten gesucht, einen halogenierten Aromaten direkt in ein primäres aromatisches Amin umzuwandeln. Eine von T. Maejima *et al.*^[110] präsentierte, eher zufällige Entdeckung, eröffnete diese Möglichkeit. Beim Versuch zur Synthese von Arylaziden aus Arylhalogeniden mittels Trimethylsilylazid unter Pd/C-Katalyse fiel auf, dass bei zusätzlicher Zugabe von Kupferkatalysatoren nicht die eigentlich erwünschten Arylazide erhalten wurden, sondern es zur Bildung von primären Aminen kam. Diese Reaktion ist ausschließlich Kupfer- und nicht Palladium-abhängig und wurde von den Autoren an kleinen Molekülen weiter verbessert. Interessant ist zu erwähnen, dass ein Additiv wie 2-Aminoethanol notwendig ist. Arbeiten zum Mechanismus dieser Reaktion zeigten, dass bei Phenylazid in Gegenwart von elementarem Kupfer keine Reduktion zum Amin erfolgt und auch in der ausschließlichen Gegenwart von 2-Aminoethanol nur eine geringfügige Umsetzung eintritt. Die Kombination aus Kupferkatalysator und Aminoethanol führte hingegen zu einer vollständigen Reduktion des Azids zum Amin. Der postulierte Mechanismus ist in Schema 3.7 gezeigt.



Schema 3.7: Vorgeschlagener Mechanismus der aromatischen Aminierung nach T. Maejima *et al.*^[110]

Zunächst wird durch eine oxidative Addition aus der Kupferspezies an dem Arylhalogenid **A** ein Kupferkomplex **B** gebildet. Dann erfolgt ein Austausch der Abgangsgruppe X^- durch ein Azid. Anschließend wird das Azid **C** durch eine Eielektronenübertragung zum Kupfer-Amid-Komplex **D** reduziert. Die reduktive Eliminierung des Kupfers findet unter Bildung des Arylamins **E** statt.^[110]

Obwohl das 9-Bromtriazolobenzotriazepin **30** ein heteroaromatischer Polyzyklus ist, der zudem noch verschiedene funktionelle Gruppen wie einen Chlorsubstituenten und eine Methoxygruppe aufweist, konnte bei der Umsetzung mit Kupferpulver und Trimethylsilylazid eine sehr gute Ausbeute (86 %) des primären Amins **32** erhalten werden (Schema 3.8).



Schema 3.8: Synthese des freien Amins **32** mit Hilfe von Aziden.

In der Veröffentlichung von T. Maejima *et al.*^[110] wird darauf hingewiesen, dass Natriumazid im Vergleich zum Trimethylsilylazid zwar ein kostengünstigeres Ausgangsmaterial ist, andererseits aber zu erheblichen Verlängerungen der Reaktionszeiten führt. Diese Beobachtung ließ sich auch in Versuchen mit dem 9-Bromtriazolobenzotriazepin **30** bestätigen. Mit Kupferpulver und Trimethylsilylazid wurden schon nach einer kurzen Reaktionszeit von 1.5 h sehr gute Ausbeuten des Amins **32** erreicht. Die Autoren beschreiben für die Verwendung von Natriumazid Kupfer(II)fluorid als optimale Kupferspezies für Umsetzung eines Arylbromids zum Arylamin. Ein entsprechender Versuch mit dem Edukt **30**, Kupfer(II)fluorid und Natriumazid führte jedoch auch nach 3 Tagen nur zu einer äußerst geringen Umsetzung des Edukts **30** zum Produkt **32**, so dass der Versuch abgebrochen wurde. Zudem sollte an dieser Stelle noch darauf hingewiesen werden, dass eine Reaktionskontrolle mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie bei Reaktionen mit Kupferpulver und Trimethylsilylazid äußerst wichtig ist, da das Produkt **32** stark zur Zersetzung neigt. Nach einer Reaktionsdauer von wenigen Stunden konnte kein Produkt **32** mehr erhalten werden.

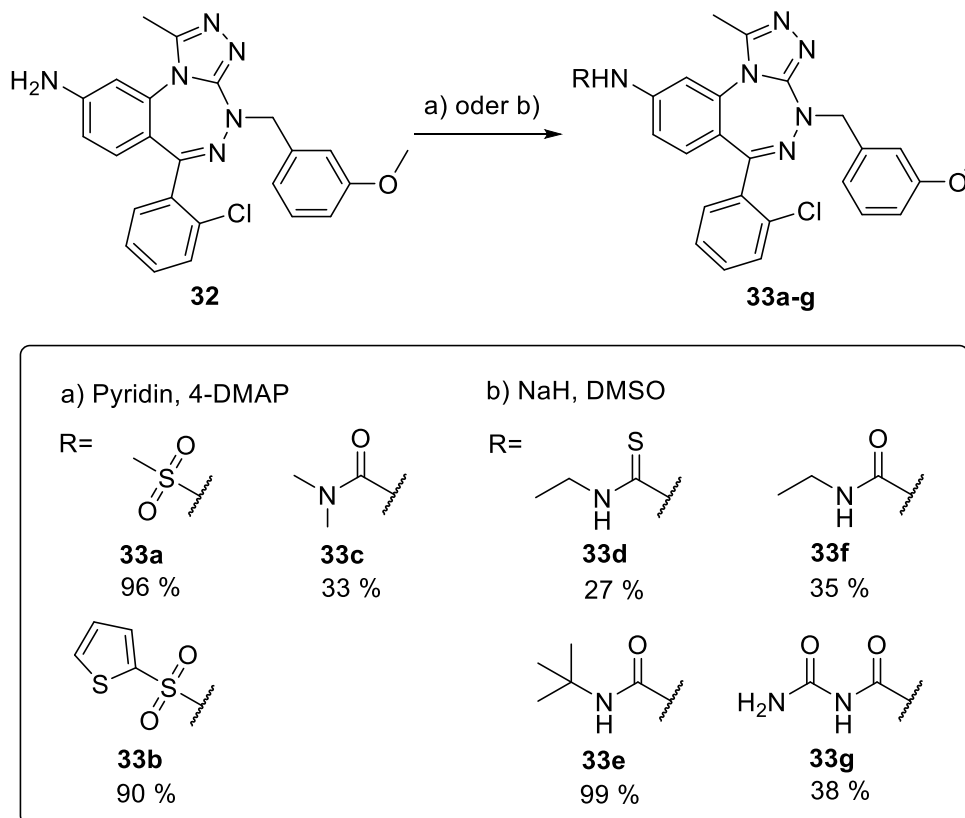
3.2.4 Funktionalisierung des 9-Aminotriazolobenzotriazepins **32**

Durch anschließende Funktionalisierung der primären Aminogruppe, konnten verschiedene Substituenten in das 9-Aminobenzotriazepin eingeführt werden. Da die Harnstoffe an Position 8 der Triazolobenzotriazepine zu einer starken Erhöhungen der Temperaturdifferenz im *Thermal Shift Assay* geführt hatten (siehe Kapitel 3.1.1), sollten derartige und weitere verwandte Substituenten nun auch in Position 9 eingebracht werden.

So entstanden unter Verwendung der Säurechloride Methansulfonylchlorid und Thiophen-2-sulfonylchlorid in Gegenwart von Hilfsbasen und DMAP die entsprechenden Sulfonamide **33a** und **33b** in Ausbeuten von 90 % bzw. 96 % (Schema 3.9). Mit *N,N*-Dimethylcarbamoylchlorid wurde in analoger Weise der *N,N*-Dimethylharnstoff **33c** in einer Ausbeute von 33 % hergestellt. Unter Verwendung von Natriumhydrid und Iso(thio)cyanaten wie Ethylisothiocyanat, *tert*-Butylisocyanat und Ethylisocyanat konnten die entsprechenden (Thio-)Harnstoffe **33d**, **33e** und **33f** in Ausbeuten von 27 % - 99 % hergestellt werden.

Die Synthese eines Harnstoffs mit primärer Carboxamid-Teilstruktur wurde in Anlehnung an eine Synthesevorschrift von G. M. Bacani *et al.*^[111] versucht. Hierzu wurde das 9-Aminotriazolobenzotriazepin **32** in einem THF/DMSO-Gemisch mittels Natriumhydrid deprotoniert und ein 10-facher Überschuss an Trimethylsilylisocyanat zugegeben, um einen TMS-geschützten Triazolobenzotriazepin-9-ylharnstoff zu erhalten. Nach Verdampfen des

Lösungsmittels im Vakuum und Resuspension in Dichlormethan, sollte die TMS-Schutzgruppe mittels Salzsäure abgespalten werden. Überraschenderweise wurde bei dieser Reaktion jedoch unter Einbau von zwei Äquivalenten des Trimethylsilylisocyanats das Biuret-Derivat **33g** in einer Ausbeute von 38 % erhalten.



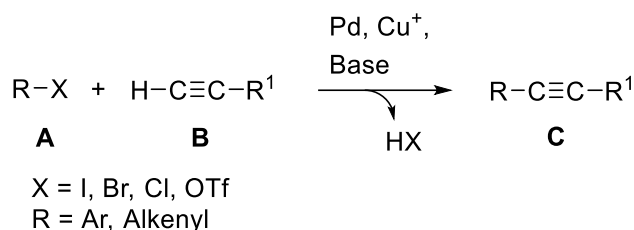
Schema 3.9: Synthese der funktionalisierten 9-Aminotriazolobenzotriazepine.

3.2.5 Funktionalisierung an C-9 des 9-Bromtriazolotriazepins **30** unter C-C-Knüpfung

Als Alternative zu den (Thio-)Harnstoff- und Amid-Resten an C-9 sollte auch untersucht werden, welche Affinität Triazolobenzotriazepine aufweisen, die an C-9 eine über einen Spacer verknüpfte distale Aminogruppe beinhalten. Hierzu war es erforderlich, über eine C-C-Knüpfungsreaktion einen einigermaßen kompakten Amin-Baustein einzuführen, damit das Produkt im Raumanpruch des Substituenten an C-9 nicht allzu sehr von den hochaffinen Harnstoffderivaten **21c** und **21e** abweicht. Eine besonders elegante Methode zur Übergangsmetall-katalysierten C-C-Knüpfung ist die Sonogashira-Reaktion.

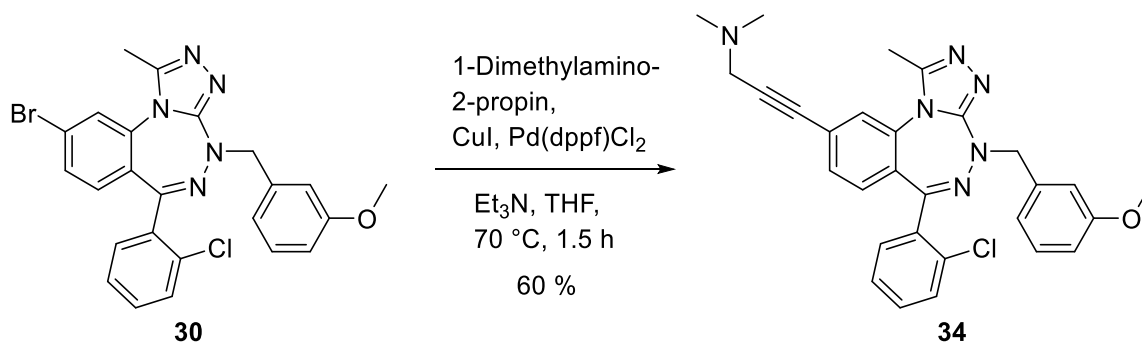
K. Sonogashira *et al.*^[112] entwickelten 1975 eine Palladium-katalysierte Reaktion zwischen terminalen Alkinen **A** und Aryl- oder Alkenylhalogeniden **B** in der Gegenwart von Additiven wie Kupfersalzen (Schema 3.10). Die Sonogashira-Kupplung ist eine Weiterentwicklung der

Stephen-Castro-Reaktion^[113], welche ebenfalls im Stande ist Alkine mit Arylhalogeniden zu kuppeln. Allerdings werden bei der Stephen-Castro-Reaktion äquimolare Mengen Kupfersalz und kein Palladium-Katalysator verwendet.



Schema 3.10: Allgemeine Gleichung der Sonogashira-Kupplung.

In Anlehnung an eine Vorschrift von T. Tremmel *et al.*^[114] konnte das 9-Bromtriazolobenzotriazepin **30** mit einem Überschuss an 1-Dimethylamino-2-propin in Gegenwart von 5 mol % [1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]palladium(II)-dichlorid und 20 mol % CuI in Tetrahydrofuran und Triethylamin in 60 % Ausbeute zum Alkin **34** umgesetzt werden (Schema 3.11).



Schema 3.11: Synthese des Alkins **34** mit Hilfe einer Sonogashira-Kupplung.

3.2.6 Ergebnisse und Diskussion des Screenings der funktionalisierten 9-Aminotriazolobenzotriazepine

Die Screenings der an C-9 variierten Triazolobenzotriazepine mittels *Thermal Shift Assays* erfolgten am SGC der Universität. Auch in dieser Testreihe wurde an jeweils acht Bromodomänen der BET-Familie (BRD2(1/2), BRD3(1/2), BRD4(1/2) und BRDT(1/2)) gescreent. Zudem wurden zur Abklärung der Selektivität die Substanzen noch an vier weiteren Bromodomänen (BAZ2B, CREBBP, PB1(5) und PCAF) getestet, die nicht der BET-Familie angehören, sondern jeweils aus unterschiedlichen Zweigen des phylogenetischen Baums der Bromodomänen stammen.

In dieser Testreihe (Tabelle 3.2) wurden nur bei wenigen Substanzen signifikante Temperaturshifts (mehr als 4 °C) gemessen. Im Allgemeinen lässt sich anhand der erhaltenen Ergebnisse sagen, dass größere Substituenten an C-9 der Triazolobenzotriazepine nicht toleriert werden. Die Sulfonamide **31a**, **33a** und **33b** zeigen, ähnlich wie die Sulfonamidanaloga in Position 8 **21a** und **21b**, keine nennenswerte Affinität zu den Bromodomänen der BET-Familie. Auch die Acetamide **31b** und **31c**, der *N*-Ethylharnstoff **33f**, das Biuret-Derivat **33g** sowie das *N,N*-Dimethylaminopropargyl-Derivat **34** besitzen eine ähnlich geringfügige Affinität für die Bromodomänen. Auch der *N*-Ethylthioharnstoff **33d** und der *tert*-Butylharnstoff **33e** weisen nur eine geringe Affinität zur BRDT(2) auf. Im Vergleich von **33e** zu dem hochaffinen, stellungsisomeren *tert*-Butylharnstoff-Derivat **21e**, welches die funktionelle Gruppe in Position 8 des Triazolobenzotriazepins beinhaltet, ist dies ein äußerst starker Affinitätsverlust. Der *N,N*-Dimethylharnstoff **33c** zeigt jedoch signifikante Temperaturshifts bei den Bromodomänen der BET-Familie und weist zudem eine hervorragend ausgeprägte Selektivität für BRD4(2) und BRDT(2) auf. Auch zeigt die halogensubstituierte Zwischenstufe 9-Bromotriazolobenzotriazepin **30** bei mäßigen Absolutwerten der Temperaturshifts doch eine beachtliche Selektivität für jeweils die zweiten Bromodomänen der BET-Familie. Zu den ersten Bromodomänen der BET-Familie sowie den Bromodomänen außerhalb der BET-Familie weist dieser Inhibitor keine nennenswerte Affinität auf.

Die besten Werte in dieser Reihe wurden mit Verbindung **32** erzielt, welche einen kleinen, primären Aminosubstituenten an C-9 beinhaltet. Diese Verbindung zeigt als einzige aus dieser Reihe hervorragende Temperaturdifferenzen unter Beibehaltung der ausgeprägten Selektivität für Bromodomänen innerhalb der BET-Familie. Das Stellungsisomer, welches an C-8 einen primären Aminosubstituenten aufweist, ist Verbindung **2**. Anhand dieser beiden aminosubstituierten Verbindungen lässt sich eine leichte Erhöhung der Affinität und Selektivität von **32** für alle zweiten Bromodomänen im Vergleich zu den ersten Bromodomänen der BET-

Familie nachweisen. So beträgt die durchschnittliche Temperaturdifferenz bei Verbindung **32** zwischen der jeweils ersten und zweiten Bromodomäne der BET-Familie 3.2 °C, bei Verbindung **2** nur 2.8 °C. Dieser Effekt könnte allerdings auch auf den Phenylring in Position 6 zurückzuführen sein, der im Fall von Verbindung **32** eine *ortho*-Chlorsubstitution aufweist. So ist mit dem an C-9 mit einer primären Aminogruppe substituierten Triazolobenzotriazepin **32** im direkten Vergleich zu dem an C-8 analog aminosubstituierten Triazolobenzotriazepin **2** eine leichte Affinitäts- und Selektivitätserhöhung gelungen. Im Vergleich zu dem *tert*-Butylharnstoff **21e** aus der C-8-Reihe sind jedoch die Temperaturdifferenzen im *Thermal Shift Assay* und somit auch die Affinität deutlich geringer. Vorteilhaft ist bei **32** allerdings die im Vergleich zu **21e** deutlich ausgeprägtere Selektivität für die jeweils zweiten Bromodomänen in der BET-Reihe.

	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	PB1(5)	PCAF
30	1.4	4.1	1.3	4.7	1.9	4.6	0.6	4.3	0.4	0.8	0.4	0.5
31a	1.1	2.1	0.9	2.0	1.7	2.1	1.7	2.3	1.1	1.9	0.8	1.3
31b	1.0	2.8	1.6	2.7	1.7	3.0	0.4	3.7	0.5	0.6	0.5	-0.2
31c	1.1	2.2	0.9	2.2	1.1	2.8	0.4	2.8	0.3	0.5	0.5	-0.7
32	3.6	6.7	4.8	6.4	4.8	6.6	1.7	7.9	1.0	1.7	1.4	1.5
33a	1.4	3.1	2.0	3.1	2.8	2.9	1.1	3.3	0.6	1.1	1.3	1.2
33b	0.3	1.9	0.5	1.7	1.1	2.0	1.0	1.9	1.4	1.8	1.4	1.0
33c	1.6	3.8	2.8	3.6	2.8	5.7	1.1	6.3	0.8	1.0	0.9	1.2
33d	2.2	2.8	2.6	2.6	2.3	3.0	1.5	4.0	0.9	1.5	1.5	1.3
33e	1.8	2.5	1.7	2.9	2.8	2.9	2.5	4.1	0.0	3.1	2.5	2.4
33f	1.1	2.1	1.4	1.9	1.9	2.3	0.7	2.6	0.6	0.9	0.9	0.6
33g	1.4	1.1	1.4	0.9	1.5	1.7	0.6	2.4	0.8	1.1	1.0	0.3
34	0.5	1.9	0.8	1.6	1.3	2.3	0.6	2.2	0.5	0.6	0.4	0.2
2	3.2	4.4	4.6	6.1	5.6	7.9	1.7	7.5	-2.3	-4.5	-3.1	-0.8
21e	6.7	3.8	8.1	9.5	10.6	10.4	5.5	11.5	0.6	2.2	0.7	0.6

ΔT_m (°C)	
	<0
	0-2
	2-4
	4-6
	6-8
	>8

Tabelle 3.2: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* der an C-9 substituierten Triazolobenzotriazepine. Zum Vergleich Ergebnisse des an C-8 mit einer primären Aminogruppe substituierten Triazolobenzotriazepins **2** und des an C-8 mit einem *tert*-Butylharnstoff substituierten Triazolobenzotriazepins **21e**.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden nach erfolgreichen Co-Kristallisationen (durchgeführt am SGC in Oxford) zwei Kristallstrukturen analysiert: von dem 9-Aminotriazolobenzotriazepin **32** mit der BRD4(1) sowie von dem Dimethylharnstoff **33c** mit der BRD2(2) (Abb. 3.5 und 3.6).

Verbindung **33c** wurde mit verschiedenen Bromodomänen co-kristallisiert, aber nur bei der BRD2(2) gelang eine aussagekräftige Kristallstrukturanalyse. Bei beiden Kristallstrukturen lassen sich die üblichen Interaktionen des Triazolrings, welcher weit in die KAc-Bindungstasche hineinreicht, erkennen. So interagiert der Stickstoff an Position 2 über ein Wassermolekül mit einem Tyrosin des Proteins und der Stickstoff in Position 3 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem hoch konservierten Asparagin der *N*-Acetyllysin-Bindungstasche. Der 6-Arylrest ragt in den hydrophoben WPF-Bereich hinein. Der Aminosubstituent der Verbindung **32** interagiert mit Valin 87 im ZA-Tunnel ebenfalls über ein Wassermolekül. Der Dimethylharnstoff der Verbindung **33c** interagiert sogar über zwei Wasserstoffbrückenbindungen direkt mit dem Protein an den Aminosäuren Aspartat 377 und Prolin 371. Auf Grund von sterischen Effekten kommt es bei dem Dimethylharnstoff-Substituenten in **33c** zu größeren Abstoßungen. Trotz zweier neu entstandener Wasserstoffbrückenbindungen werden daher mit dem *N,N*-Dimethylharnstoff **33c** kleinere Temperaturdifferenzen als mit dem kompakten, primären Amin **32** im *Thermal Shift Assay* erreicht.

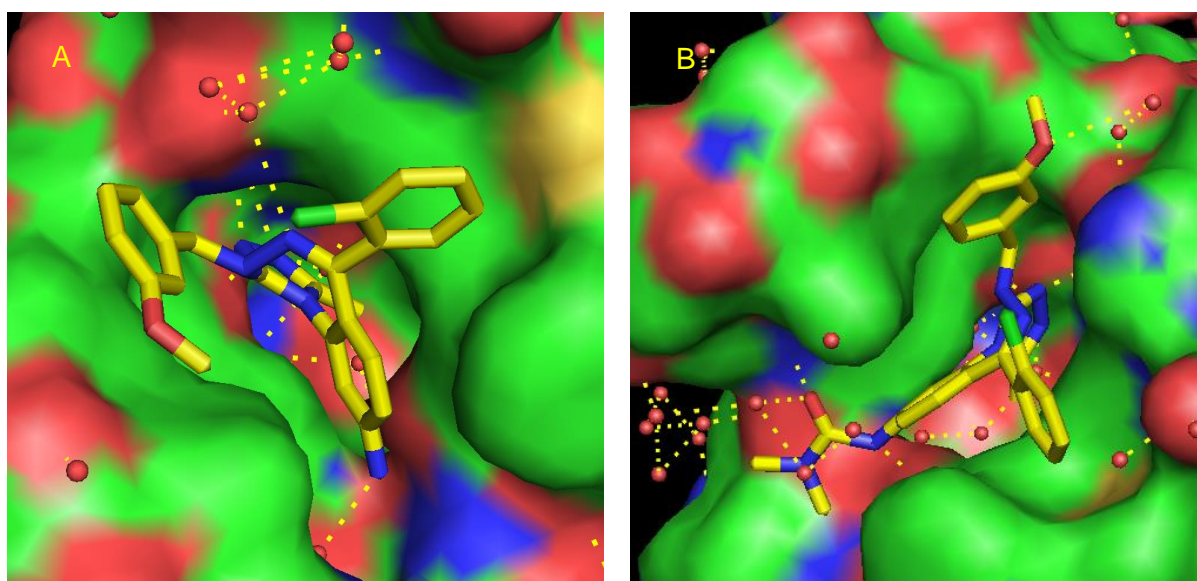


Abbildung 3.5: Co-Kristallstrukturen; A) BRD4(1) mit Amin **32**; B) BRD2(2) mit *N,N*-Dimethylharnstoff **33c**.

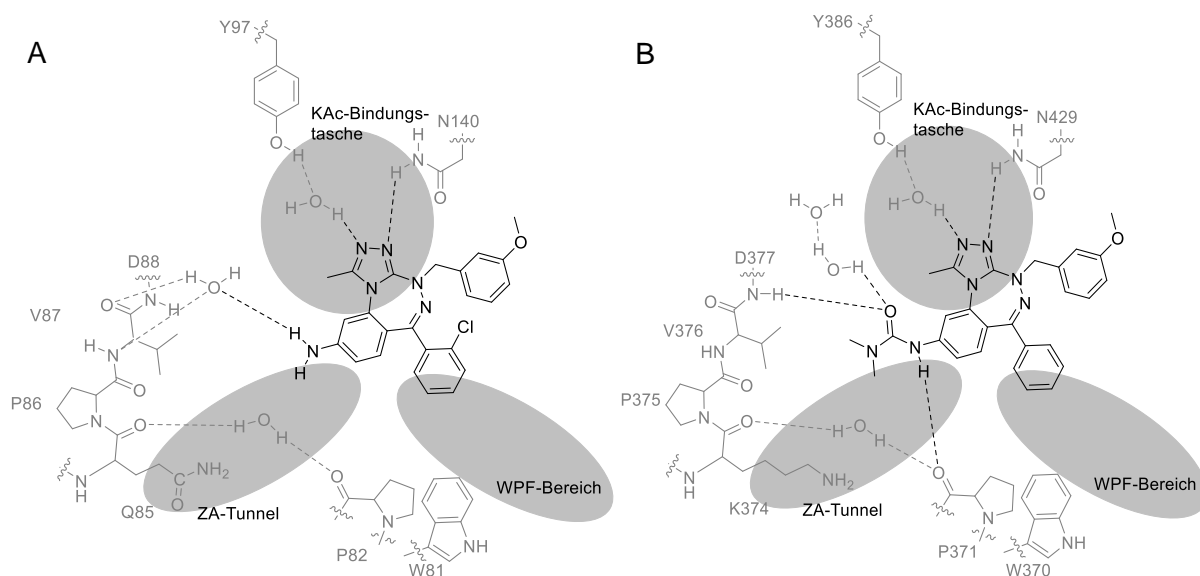


Abbildung 3.6: Schematische Darstellungen der Interaktionen in den Co-Kristallstrukturen; A) BRD4(1) mit Amin **32**; B) BRD2(2) mit *N,N*-Dimethylharnstoff **33c**. Die Abbildungen sind angelehnt an Darstellungen von D. S. Hewings *et al.*^[54] und D. Gallenkamp *et al.*^[92]

Zusammengefasst lässt sich anhand der beiden Testreihen der Triazolobenzotriazepine mit unterschiedlichen Substitutionsmustern an den Positionen C-8 und C-9 sagen, dass polare Substituenten, die in den ZA-Tunnel hineinreichen und dort Wasserstoffbrücken ausbilden können, zu einer Verbesserung der Affinität der Inhibitoren führen. Aus sterischen Gründen können in Position 9 jedoch nur kleinere Substituenten, wie z. B. ein primärer Aminosubstituent, eingebracht werden, um eine Erhöhung der Affinität zu erreichen. In Position 8 hingegen werden auch sterisch anspruchsvollere polare Substituenten wie der *N,N*-Dimethylharnstoff oder auch der *tert*-Butylharnstoff toleriert und steigern hier die Affinität der Inhibitoren zu den Bromodomänen erheblich. Durch Bildung mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen wird die Affinität der Inhibitoren stark erhöht.

Für die hier betrachtete Stoffklasse der 9-substituierten Triazolobenzotriazepine hatten diese Erkenntnisse zur Folge, dass wegen der limitierenden sterischen Verhältnisse keine vielversprechenden Optionen für eine weitere Optimierung der Substituenten an dieser Position gesehen wurden.

3.3 Synthesen der Triazolothienotriazepine

Innerhalb dieser Dissertation wurde aufbauend auf bisherigen Ergebnissen und der Dissertation von M. Wrobel neben den Triazolobenzotriazepinen auch noch Triazolothienotriazepine untersucht, welche formal Hybridstrukturen aus Wrobels Verbindungen mit dem Triazolothienodiazepin **JQ1**^[83] darstellen.

Da Ergebnisse von M. Wrobel^[93] nahe legten, dass sich *ortho*-Chlorsubstituenten am Phenylring an Position 6 von Triazolobenzotriazepinen positiv auf die Selektivitäten für die jeweils zweiten Bromodomänen der BET-Familie auswirken, sollten bei den anvisierten Hybridstrukturen auch *ortho*- und *para*-chlorsubstituierte Phenylringe verglichen werden. Ferner sollte auch bei diesen Hybridstrukturen der Benzylrest mit der höchsten Affinität gesucht werden. Um alle Ergebnisse optimal vergleichen zu können, wurden dementsprechend zwei analoge Reihen von JQ1-Hybridstrukturen angefertigt, die sich nur in der *para*- bzw. *ortho*-Chlorsubstitution am 4-Phenylrest unterscheiden (Abb. 3.7). Zur Vereinfachung werden von nun an diese beiden Serien als „*p*-Cl-JQ1-Anologa“ bzw. „*o*-Cl-JQ1-Anologa“ bezeichnet. Da der neue Grundkörper einen Fünfring (Thiophen) aufweist, im Gegensatz zu den Triazolobenzotriazepinen, welche einen Sechsring (Benzen) beinhalten, kommt es zu einer leichten Veränderung der Geometrie der Inhibitoren. Die Geometrieänderung der Inhibitoren könnte wiederum zu veränderten Wechselwirkungen in der Bindungstasche der Bromodomänen führen (Abb. 3.7). Daher lassen sich die schon erzielten Erkenntnisse aus der Triazolobenzotriazepin-Reihe nicht direkt auf die Triazolothienotriazepine übertragen. Vielmehr muss erneut eine systematische Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen durchgeführt werden.

Auf Grund des Thiophenrings in den JQ1-Anologa anstelle des Benzenrings in den Triazolobenzotriazepinen ändert sich die Nummerierung der Lokanten. Die neue Nummerierung ist in Abb. 3.7 dargestellt. Die Synthesestrategie zur Herstellung der Triazolothienotriazepine wurde angelehnt an die schon von uns etablierte Synthese der Triazolobenzotriazepine (Schema 3.16).

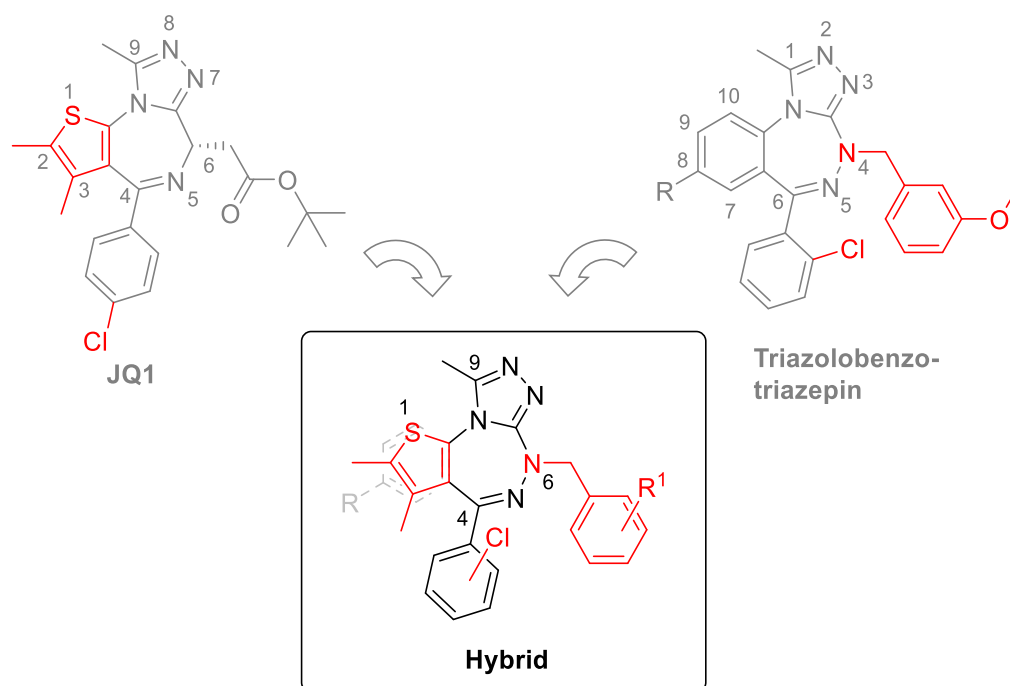
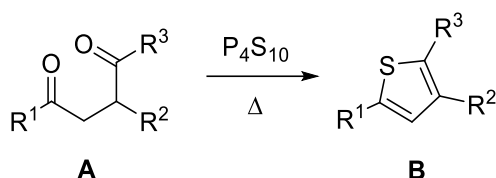


Abbildung 3.7: Ausgehend von **JQ1** und den Triazolobenzotriazepinen wurde eine neue Hybridstruktur entworfen. Die anvisierten Hybridmoleküle haben auf Grund des neu eingeführten Fünfrings (Thiophen) im Vergleich zu den Triazolobenzotriazepinen eine veränderte Molekülgeometrie. Daher müssen auch am Benzyl- und Phenylring die Substitutionsmuster neu optimiert werden. Es wurden zwei Serien angefertigt: *p*-Cl-JQ1-Anologa und *o*-Cl-JQ1-Anologa mit unterschiedlich substituierten Phenylresten an C-4.

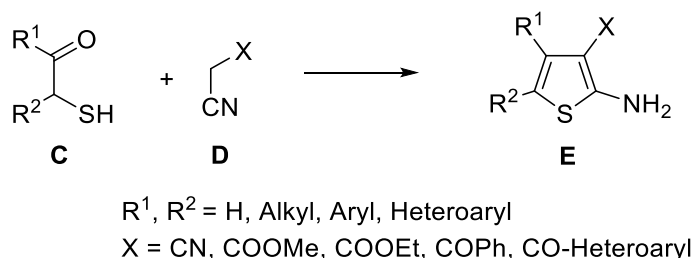
3.3.1 Synthesen der 2-Aminothiophen-Grundbausteine

Als Ausgangsmaterial für die Triazolothienotriazepin-Synthesen wurde anstelle der in der Triazolobenzotriazepin-Synthese erfordernten 2-Aminobenzophenone (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(phenyl)methanone benötigt, welche am Phenylring in *para*- bzw. *ortho*-Position einen Chlorsubstituenten aufweisen. Hierzu wurden Methoden gesucht, geeignet substituierte Thiophene aufzubauen. Zwei der bekanntesten Methoden zur Thiophensynthese sind die Paal-Knorr-Synthese^[115] und die Gewald-Reaktion^[116]. Mit der klassischen Paal-Knorr-Thiophensynthese können aus 1,4-Diketonen in Gegenwart einer Schwefelquelle (z. B. Phosphor(V)sulfid) Thiophene dargestellt werden (Schema 3.12). Die gewünschten Zwischenprodukte **10** bzw. **11** (Schema 3.15) enthalten jedoch an C-2 des Thiophenrings eine primäre Aminogruppe und an C-3 einen Benzylrest. Beides ist mit der Paal-Knorr-Synthese nicht zu erhalten, so dass diese klassische Methode nicht in Betracht gezogen wurde.



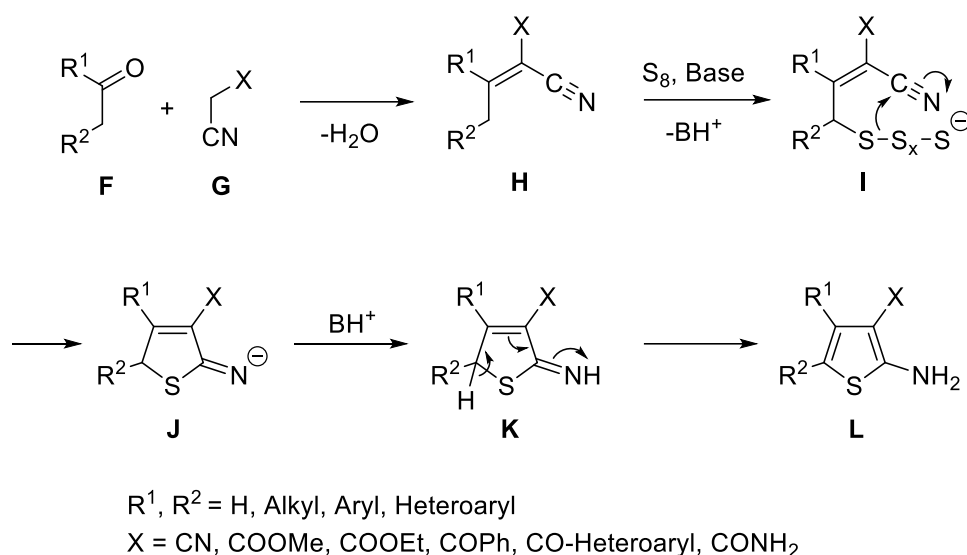
Schema 3.12: Thiophensynthese aus einem 1,4-Diketon **A** und Phosphor(V)sulfid nach Paal-Knorr.^[115]

K. Gewald veröffentlichte 1961 eine erste Variante einer 2-Aminothiophen-Synthese, bei welcher α -Mercaptoketone **C** mit Nitrilen **D**, welche eine elektronenziehende Gruppe an C-2 aufweisen, unter basischen Bedingungen umgesetzt werden (Schema 3.13).^[117] Besonders interessant ist, dass sich so optional auch Ketogruppen an C-3 einführen lassen.



Schema 3.13: Erste Variante der 2-Aminothiophen-Synthese aus α -Mercaptoketonen **C** und aktivierten Nitrilen **D** von K. Gewald.^[117]

Auf Grund der schwer darzustellenden Edukte, welche zudem nach Berichten von R. Sabnis *et al.*^[118] instabil sind, entwickelte K. Gewald noch weitere Varianten seiner 2-Aminothiophen-Synthese. Die klassische Gewald-Reaktion wurde 1966 veröffentlicht, und hat den Vorteil, dass die Edukte meist käuflich zu erhalten sind und in einem Eintopfverfahren unter einfachen Bedingungen zu den gewünschten 2-Aminothiophenen umgesetzt werden können.^[116] So können 2-Amino-3-acylthiophene aus einfachen Bausteinen, wie Ketonen oder Aldehyden, aktivierten Nitrilen und elementarem Schwefel, in Anwesenheit von Basen aufgebaut werden.

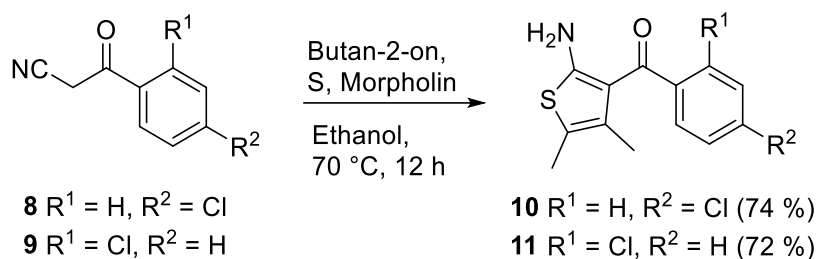


Schema 3.14: Vorgeschlagener Mechanismus der Gewald-Reaktion.^[116, 118]

Der Mechanismus (Schema 3.14) verläuft zunächst über eine Knoevenagel-Kondensation des aktivierten Nitrils **G** mit dem Aldehyd/Keton **F** zum α -Alkylidennitril **H**. Der elementare Schwefel greift vermutlich nach Deprotonierung an der CH-aciden Methylengruppe an. Anschließend erfolgt ein Ringschluss unter Bildung von **J**. Folgende Tautomerisierung führt zum gewünschten 2-Aminothiophen **L**. Schon K. Gewald *et al.* favorisierte diesen Mechanismus, welcher einige Jahre später von R. Sabnis *et al.* anschaulich dargestellt wurde.^[116, 118] Vollständig aufgeklärt ist der Mechanismus dieser Reaktion bis heute nicht.

Diese neue Version der Gewald-Reaktion bot sich zur Synthese der zentralen Intermediate **10** bzw. **11** an, da diese es ermöglicht, 2-Amino-3-arylthiophene aus einfachen Bausteinen wie Benzoylacetonitril, Butan-2-on und elementarem Schwefel in der Anwesenheit von der Base Morpholin aufzubauen (Schema 3.15).

Alle Edukte wurden hierzu in äquimolaren Mengen in Ethanol gelöst und 12 h auf 70 °C erwärmt. Diese Reaktion wurde auch schon bei der **JQ1**-Synthese zur Synthese des (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(4-chlorphenyl)methanon (**10**) aus 4-Chlorbenzoylacetonitril (**8**) und Butan-2-on genutzt.^[83] Sowohl das literaturbekannte (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(4-chlorphenyl)methanon (**10**) als auch das (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (**11**) konnten mit Ausbeuten von 74 % (entspricht der Literatur^[83]: 70 %) bzw. 72 % als gelbe Feststoffe erhalten werden.



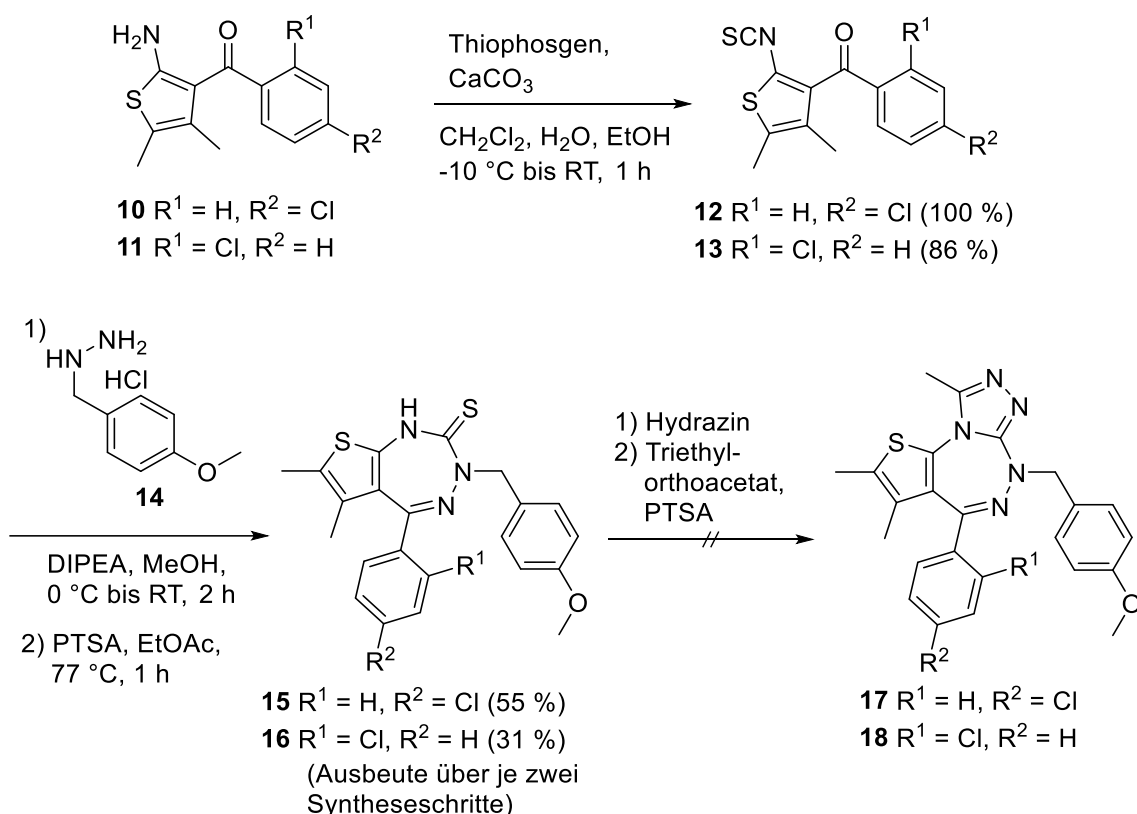
Schema 3.15: Synthese der (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(chlorphenyl)methanon-Intermediate **10**^[83] und **11**.

3.3.2 Synthese der PMB-geschützten JQ1-Analoga

In Analogie zu der oben beschriebenen, von P. Richter *et al.*^[97] entwickelten Strategie zur Synthese von Triazolobenzotriazepinen wurden die (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(chlorphenyl)methanone **10** und **11** mit einem Überschuss an Thiophosgen mit sehr guten Ausbeuten von 86 - 100 % zu den Isothiocyanaten **12** und **13** umgesetzt (Schema 3.16).

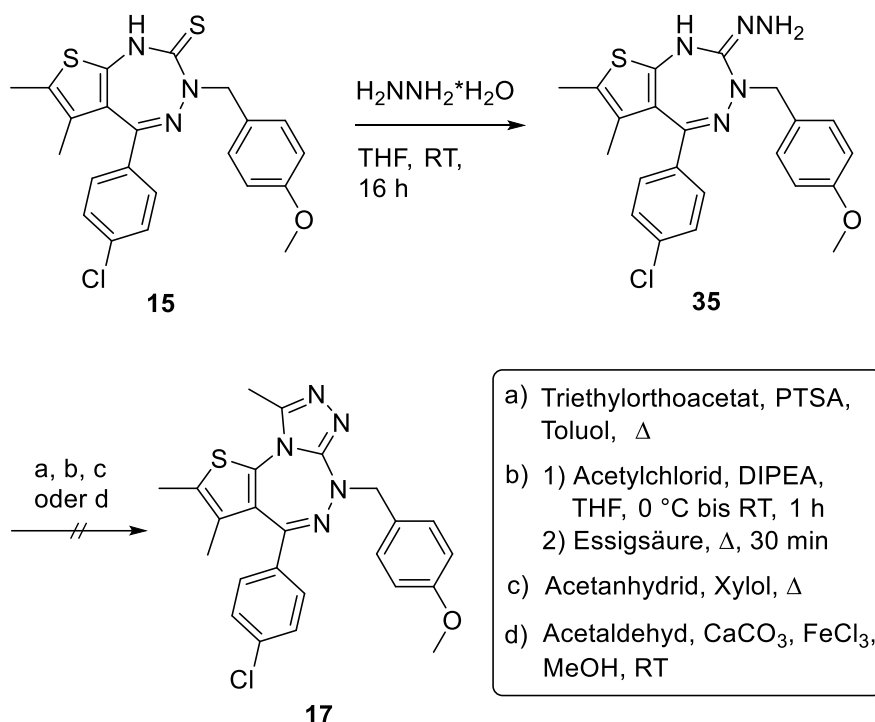
Das für die folgenden Synthesen der Thienotriazepinthione **15** und **16** erforderliche 4-Methoxybenzylhydrazin (**5**) liefert eine Synthese von M. Wrobel^[93], welche auch für das 3-Methoxybenzylhydrazin (**14**) angewandt wurde (vergleiche Kapitel 3.2.2). In diesem Fall wird mit dem verwendeten 4-Methoxybenzylhydrazin (**14**) eine vom Stickstoff mit HBr abspaltbare *para*-Methoxybenzyl-(PMB-)Schutzgruppe erhalten. So kann nach Aufbau des Triazolrings in Position 6 über Entschützung und erneute *N*-Alkylierung eine Vielzahl verschiedener Benzylgruppen eingeführt werden.

Angelehnt an Methoden von T. Nakamura *et al.*^[96] erfolgte die Reaktion der Isothiocyanate **12** und **13** mit je einem leichten Überschuss an 4-Methoxybenzylhydrazin (**14**). Nachfolgende Behandlung des offenkettigen Zwischenprodukts mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zur Cyclisierung lieferte die Thienotriazepinthione **15** und **16** in mäßigen Ausbeuten von 31 % bzw. 55 %. Die Cyclisierung scheint auf Grund der erhöhten Elektronendichte am Thiophenring deutlich schlechter zu verlaufen als bei den Synthesen der entsprechenden Benzotriazepinthione. Darauf folgende Versuche zur Kondensation der Thienotriazepinthione **15** und **16** mit Hydrazin und Cyclisierung mit Triethylorthoacetat sowie einer katalytischen Menge an *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat^[99] nach der etablierten Methode lieferten überraschenderweise nicht die gewünschten Produkte **17** und **18**.



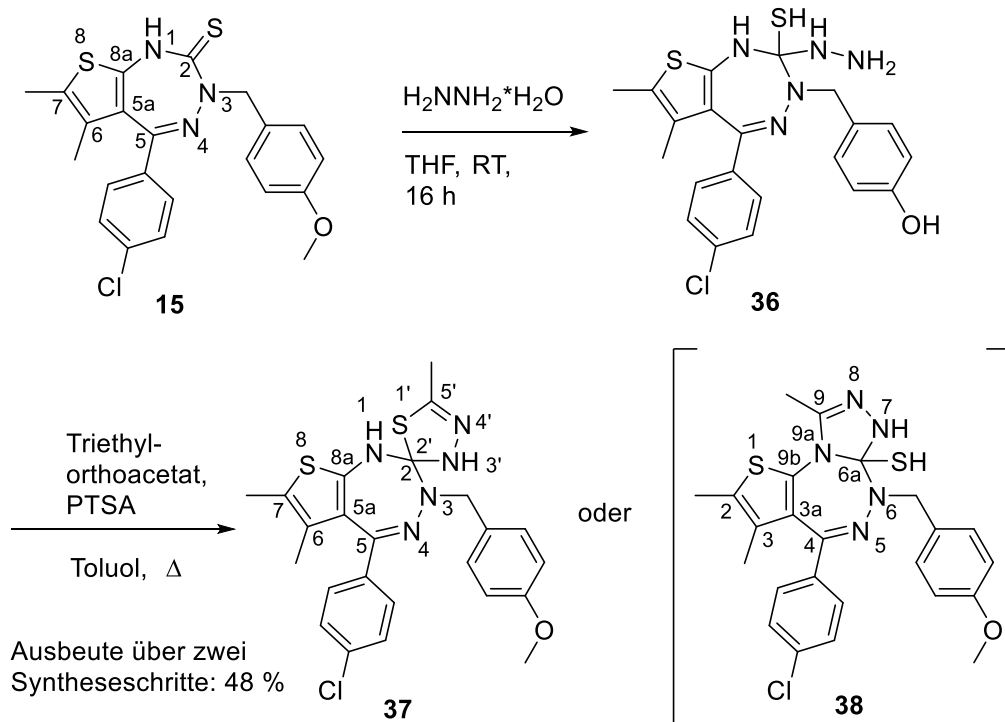
Schema 3.16: Versuche zur Synthese der Triazolothienotriazepine, welche am 4-Phenylring *para*- bzw. *ortho*-chlorsubstituiert sind ("*p*-Cl-JQ1-Anologa" bzw. "*o*-Cl-JQ1-Anologa").

Da die Triazolring-Synthese, die angelehnt an eine Methode von H. Sueoka *et al.*^[99] bei der Triazolobenzotriazepin-Synthese gut funktioniert hatte, aber bei den Thienotriazepinen nicht erfolgreich war, musste der Aufbau des Triazolrings an Thienotriazepinen neu überdacht werden. Zunächst wurde angenommen, dass die Kondensation des Thienotriazepinthions **15** mit Hydrazin in Tetrahydrofuran bei Raumtemperatur gelungen war. Dafür sprachen Daten der Dünnschichtchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 3:1; Thienotriazepinthion **15** $R_f = 0.54$, Produkt $R_f = 0.11$) und einem ^1H -NMR-Spektrum (Hydrazon-NH₂ bei 3.63 ppm) des nicht aufgereinigten Zwischenprodukts **35**. Daher wurden weitere Reagenzien zum Ringschluss wie Acetylchlorid und DIPEA^[119] oder auch Acetanhydrid in Xylol oder Acetaldehyd mit Eisenchlorid und Calciumcarbonat^[120] ausprobiert (Schema 3.17). Keine dieser Methoden war erfolgreich und so wurde noch einmal die gesamte Synthese überdacht.



Schema 3.17: Erfolgreiche Versuche zum Aufbau des Triazolrings.

Für das aufgereinigte Produkt des ersten Versuchs mit Triethylorthoacetat wurde eine Vollanalytik durchgeführt. Das Produkt zeigte im ESI+ eine exakte Masse von $m/z = 498.1184$. Das wiederum lässt auf eine Verbindung mit der folgenden Summenformel schließen: $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{ClN}_5\text{OS}_2^+$ (berechnet: $m/z = 498.1189$). Danach hatte das Hydrazin tatsächlich mit dem Thienotriazepinethion **15** reagiert und auch die folgende Reaktion mit dem Triethylorthoacetat hatte stattgefunden, führte aber nicht zu den jeweils gewünschten Produkten (Schema 3.18). Die Bildung des Hydrazonothienotriazepins **35** verlief demnach schon ohne Erfolg, da das Produkt laut Massenspektrum zwar das Hydrazin, aber eben auch noch ein Schwefelatom enthielt. Offensichtlich wurde das Hydrazin zwar an die Thiongruppe addiert, jedoch blieb die Eliminierung von H_2S unter Bildung des gewünschten Hydrazonothienotriazepins **35** aus. Das resultierende Orthokohlensäurederivat **36** mit geminalen Thiol- und NH_2 -Gruppen reagierte mit dem Triethylorthoacetat weiter. Neben der distalen Aminogruppe der Hydrazinkomponente, welche auf Grund des α -Effekts äußerst nukleophil ist, ging auch die Thiolgruppe diese Reaktion ein. Das Thiol sollte deutlich nukleophiler sein als das aromatische Amin N-1 mit einem *ortho*-ständigen, elektronenziehenden Imin-Strukturelement. Aus dieser Reaktion resultiert somit die Spiroverbindung **37** und nicht das isomere Triazolothienotriazepin **38** mit Thiolrest an C-6a. Es ist bei diesen Verbindungen zu beachten, dass sich auf Grund der Anellierung die Nummern der Lokanten ändern. Daher wurde die Nummerierung des Grundgerüsts in Schema 3.18 dargestellt.



Schema 3.18: Bildung der Spiroverbindung **37** bei dem erfolglosen Versuch, den Triazolring aufzubauen. Die isomere Struktur **38** konnte auf Grund von NMR-Analysen ausgeschlossen werden.

Anhand der HMBC-Daten (Abb. 3.8) lässt sich erkennen, dass die entstandenen NH-Gruppen drei unterschiedliche Kopplungspartner aufweisen, was für die Spiroverbindung **37** und gegen die Dihydrotriazolthiolverbindung **38** spricht. Im HMBC koppelt das 3'-NH der Verbindung **37**, welches im ^1H -NMR-Spektrum bei 11.24 ppm zu sehen ist, mit C-2 (C_{spiro}) (im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 170.1 ppm) und mit C-5' (bei 151.0 ppm). Das 1-NH, welches im ^1H -NMR-Spektrum bei 6.84 ppm zu erkennen ist, koppelt mit C-5a (im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 134.2 ppm). Die Dihydrotriazolthiolverbindung **38** würde am NH dieselben Kopplungen aufweisen, wie das 3'-NH der Verbindung **37**, nämlich das quartäre C neben der Methylgruppe sowie das quartäre C des Orthokohlensäurederivats, jedoch müsste das Thiolwasserstoff ebenfalls mit dem quartären C des Orthokohlensäurederivats koppeln und hätte keine weiteren möglichen Kopplungspartner.

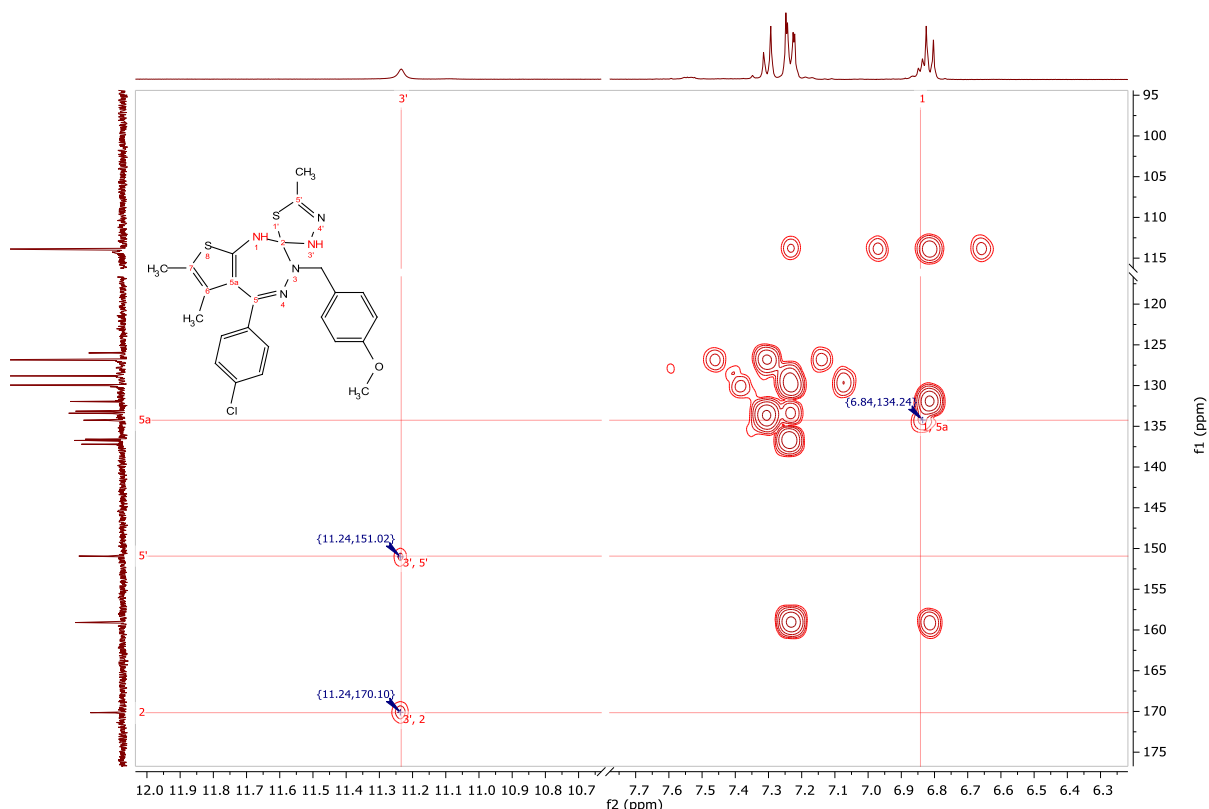
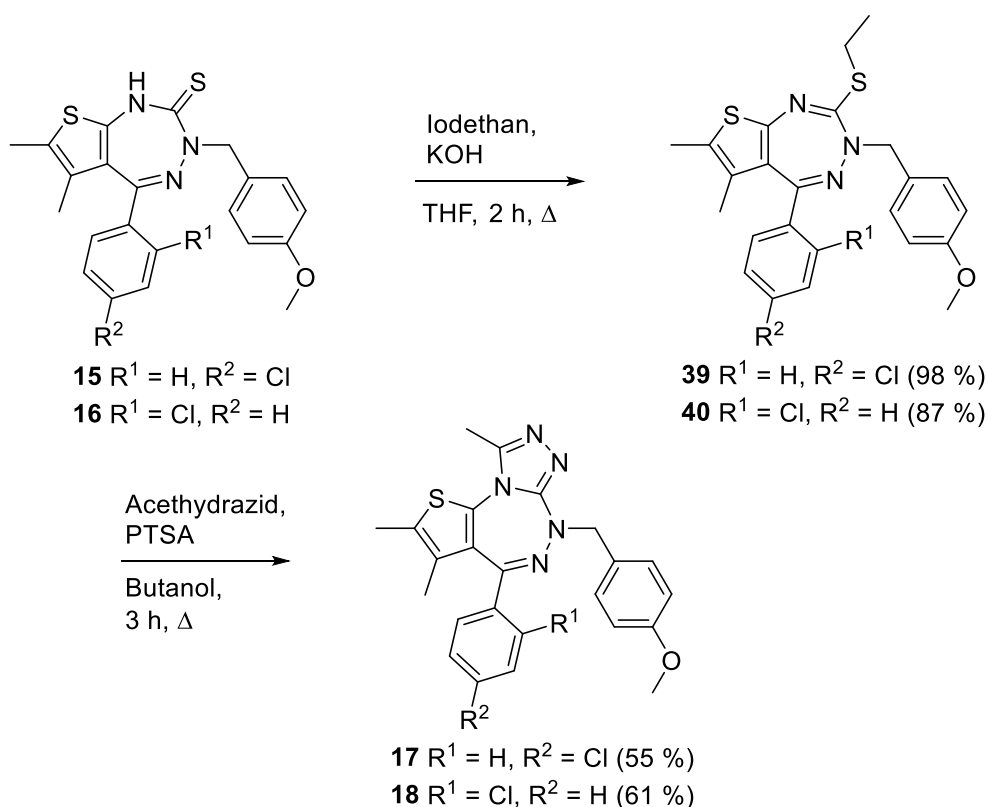


Abbildung 3.8: HMBC der Spiroverbindung **37**. Beide NH-Gruppen haben unterschiedliche Kopplungspartner. So koppelt das 3'-NH, welches im ^1H -NMR-Spektrum bei 11.24 ppm zu sehen ist, mit C-2 (im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 170.1 ppm) und mit C-5' (bei 151.0 ppm). Das 1-NH, welches im ^1H -NMR-Spektrum bei 6.84 ppm zu erkennen ist, koppelt mit C-5a (im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 134.2 ppm).

Da somit auf klassischem Weg eine Anellierung des Triazolrings nicht möglich war, musste ein alternatives Verfahren gefunden werden. Hierbei wurde auf die von M. Di Braccio *et al.*^[121] beschriebene Methode zum Aufbau eines Triazolrings über eine Alkylthioverbindung zurückgegriffen. Der durch Alkylierung des Thions generierte S-Alkylrest ist eine deutlich bessere Abgangsgruppe als die Thiolgruppe. Die Alkylthioverbindung kann in einem zweiten Schritt direkt mit Acethydrazid zum Triazolring cyclisiert werden, so dass hier, wie bei der Umsetzung des Thions mit Hydrazin und dann Triethylorthoacetat, auch nur zwei Syntheseschritte erforderlich sind.

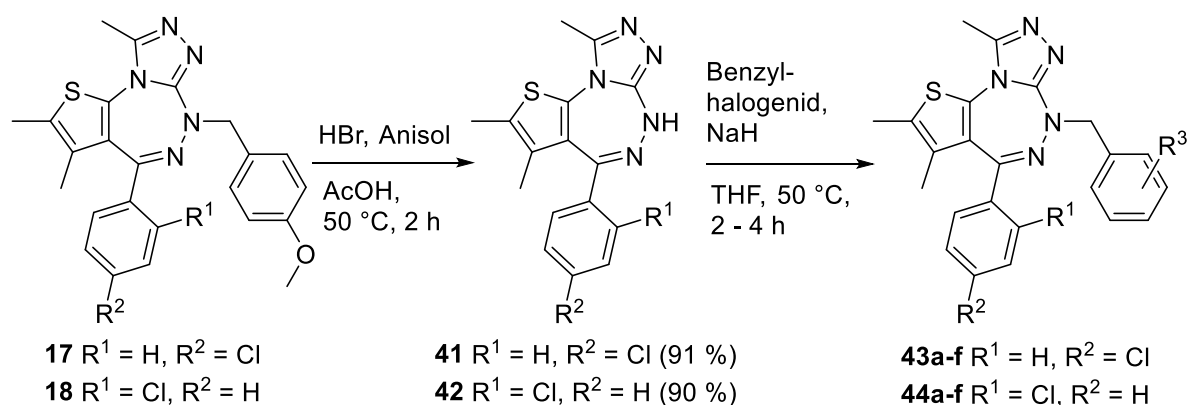
Die S-Alkylierungen der Thienotriazepinthione **15** bzw. **16** mittels eines kleinen Überschusses an Iodethan und Kaliumhydroxid in siedendem Tetrahydrofuran zu den Produkten **39** und **40** verlief äußerst erfolgreich mit Ausbeuten von 98 % des **39** bzw. 87 % des **40** (Schema 3.19). Auch die darauffolgende Cyclisierung mit Acethydrazid in Butan-1-ol und einer katalytischen Menge an *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat gelang mit soliden Ausbeuten von 55 % bzw. 61 %.



Schema 3.19: Synthese der Triazolothienotriazepine **17** und **18**.

3.3.3 Einführung neuer Benzylreste an den JQ1-Analoga

Um die beiden entstehenden Serien der *p*-Cl-JQ1-Analoga und der *o*-Cl-JQ1-Analoga miteinander vergleichen zu können, wurde in beiden Serien die *p*-Methoxybenzyl-Schutzgruppe durch jeweils dieselben substituierten Benzylgruppen ersetzt. Zunächst wurden, mit Hilfe von 45 %igem Bromwasserstoff in Eisessig und Anisol als Scavenger, die *p*-Methoxybenzyl-Schutzgruppen der Verbindungen **17** und **18** abgespalten (Schema 3.20). Es entstanden die entschützten Produkte **41** und **42** in Ausbeuten von 90 % bzw. 91 %. Die Verbindungen **41** und **42** wurden mit einem leichten Überschuss an Natriumhydrid deprotoniert und anschließend mit Benzylbromiden oder Benzylchloriden versetzt (Tabelle 3.3).^[122] Es wurden je sechs verschiedene Benzylreste (mit *para*-Nitro-, *para*-Iod-, *meta*-Chlor-, *meta*-Methoxy-, 3,5-Dimethoxy- und 3,4,5-Trimethoxysubstitution) an Position 6 eingebracht. Die Ausbeuten lagen im Bereich von 53 % bis 86 %.



Schema 3.20: Synthese der Triazolothienotriazepine **43a-f** bis **44a-f**. Die Abspaltung der PMB-Schutzgruppen von **17** und **18** erfolgt mit HBr in Eisessig und die Benzylierung des N-4 gelang mit Natriumhydrid und Benzylhalogeniden.

Benzylhalogenid	Substitution			Produkt	
	$R^1 =$	$R^2 =$	$R^3 =$	Nummer	Ausbeute
Br	H	Cl	4-Nitro	43a	65 %
Br	H	Cl	4-Iod	43b	53 %
Br	H	Cl	3-Chlor	43c	63 %
Br	H	Cl	3-Methoxy	43d	64 %
Br	H	Cl	3,5-Dimethoxy	43e	78 %
Cl	H	Cl	3,4,5-Trimethoxy	43f	72 %
Br	Cl	H	4-Nitro	44a	62 %
Br	Cl	H	4-Iod	44b	86 %
Br	Cl	H	3-Chlor	44c	73 %
Br	Cl	H	3-Methoxy	44d	86 %
Br	Cl	H	3,5-Dimethoxy	44e	59 %
Cl	Cl	H	3,4,5-Trimethoxy	44f	86 %

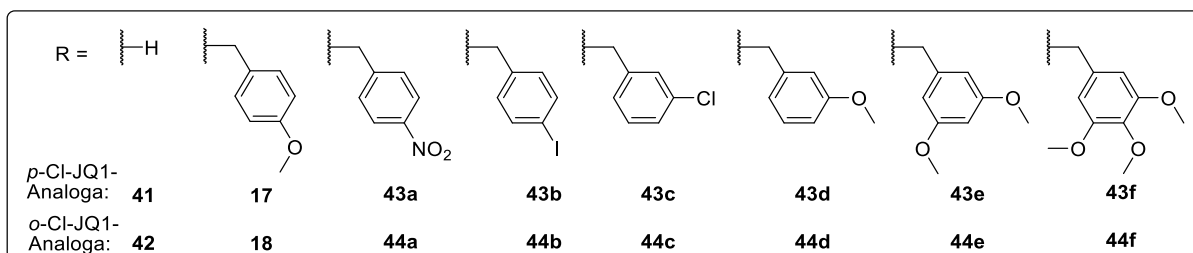
Tabelle 3.3: Derivatisierung der 6*H*-Triazolothienotriazepinderivate **41** und **42** mit je sechs verschieden substituierten Benzylhalogeniden.

3.3.4 Ergebnisse und Diskussion der Screenings der JQ1-Analoga

Die *p*-Cl-JQ1-Analoga und die *o*-Cl-JQ1-Analoga wurden am SGC der Universität Oxford mit einem *Thermal Shift Assay* untersucht. Hierbei wurde an jeweils acht Bromodomänen der BET-Familie (BRD2(1/2), BRD3(1/2), BRD4(1/2), und BRDT(1/2)) gescreent. Zudem wurde noch an vier weiteren Bromodomänen (BAZ2B, CREBBP, PB1(5) und PCAF) getestet, die nicht der BET-Familie angehören, sondern jeweils aus unterschiedlichen Zweigen des phylogenetischen Baums der Bromodomänen stammen.

In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* für die *p*-Cl-JQ1-Analoga und die *o*-Cl-JQ1-Analoga aufgelistet. In Tabelle 3.5 werden die Selektivitäten der Inhibitoren für die jeweils zweiten Bromodomänen verglichen und in Tabelle 3.6 werden die Affinitäten mit analogen Triazolobenzotriazepinen verglichen.

3. Ergebnisse und Diskussion



		BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	PB1(5)	PCAF
	41	2.5	4.9	4.4	5.9	4.9	5.1	1.1	5.6	0.1	-1.5	0.1	0.1
	17	6.0	8.6	8.0	8.8	8.8	9.4	3.7	9.5	-0.6	-1.0	-0.3	-0.7
	43a	5.0	7.9	6.7	8.5	8.5	8.7	3.4	8.9	-0.2	-1.3	-0.3	-0.4
	43b	4.1	6.7	5.6	6.4	5.7	6.9	1.6	6.7	-0.3	-2.0	0.1	-0.2
	43c	4.6	7.1	6.9	7.3	7.1	7.4	2.5	7.4	0.0	-2.2	-0.1	-0.1
	43d	6.3	9.2	8.7	9.3	9.4	9.6	4.2	9.8	-0.7	-1.7	-0.9	-1.1
	43e	6.0	8.8	8.2	8.2	9.4	8.9	4.1	9.8	-0.8	-1.5	-0.4	-0.6
	43f	5.2	7.0	7.0	8.1	7.8	7.4	3.2	8.1	0.0	-1.0	0.0	0.2
	42	2.7	5.2	3.9	5.9	3.7	5.5	1.3	5.7	-0.5	-1.3	-0.2	-0.2
	18	2.1	5.7	3.3	6.7	3.7	7.3	0.6	7.7	-0.2	-0.8	-0.2	0.0
	44a	2.0	6.2	3.3	6.7	3.5	7.0	0.6	7.1	0.0	-1.3	-0.2	-0.2
	44b	0.4	4.4	1.4	4.4	0.8	5.2	-1.0	4.5	-0.5	-2.1	-0.6	-0.9
	44c	2.1	6.1	3.5	7.0	3.4	7.4	0.4	7.4	-0.5	-2.7	-0.7	-0.5
	44d	2.8	5.4	4.2	6.5	4.4	6.1	1.1	6.4	-0.1	-1.3	-0.2	0.1
	44e	3.5	6.4	4.9	7.0	5.4	7.2	1.6	7.5	-0.6	-1.6	-0.3	-0.2
	44f	2.3	5.5	3.7	6.5	4.2	6.7	0.6	6.3	-0.2	-1.5	-0.3	-0.4

ΔT_m (°C)
<0
0-2
2-4
4-6
6-8
>8

Tabelle 3.4: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* oben für die *p*-Cl-JQ1-Analoga und unten für die *o*-Cl-JQ1-Analoga.

In diesen Testreihen wurden für alle Verbindungen signifikante Temperaturshifts (mehr als 4 °C) an Bromodomänen gemessen (Tabelle 3.4). Werden zunächst die *p*-Cl-JQ1-Analoga betrachtet, so lässt sich bei allen Verbindungen feststellen, dass diese eine ausgeprägte Affinität zu allen Bromodomänen der BET-Familie außer der BRDT(1) aufweisen, wobei es keine signifikanten Kreuzreaktivitäten zu den Bromodomänen außerhalb der BET-Familie gibt.

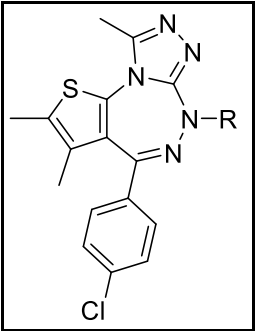
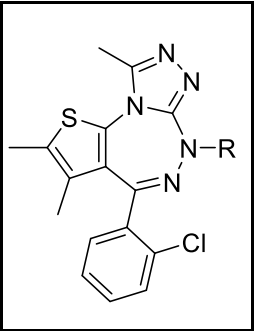
Die Verbindung ohne Benzylgruppe **41** weist die geringsten Temperaturdifferenzen auf. Die am Benzylrest *para*-, *meta*- und dimethoxysubstituierten Verbindungen **17**, **43d** und **43e** weisen eine stark erhöhte Affinität zu allen Bromodomänen der BET-Familie außer der BRDT(1) auf. Der trimethoxysubstituierte Benzylrest in **43f** verringert die Affinität wieder etwas.

Ist der Benzylrest in *para*-Position mit einer Nitro-Gruppe substituiert (Verbindung **43a**), so bleibt die Affinität ähnlich hoch, wie bei den Analoga mit Methoxyresten. Der *para*-Iodbenzylrest in Struktur **43b** hingegen verringert die Affinität, wie auch die *meta*-Chlorbenzylgruppe in **43c**.

Die *p*-Cl-JQ1-Analoga zeigen im Vergleich zu den *o*-Cl-JQ1-Analoga deutlich erhöhte Temperaturdifferenzen in den Schmelzpunkten der inhibierten Bromodomänen. Werden die *o*-Cl-JQ1-Analoga betrachtet, so lässt sich bei allen Verbindungen feststellen, dass diese, anders als die wenig selektiven Vertreter der *p*-Cl-JQ1-Reihe, eine teils sehr ausgeprägte Affinität zu den jeweils zweiten Bromodomänen der BET-Familie aufweisen und es keine signifikanten Kreuzreaktivitäten zu den Bromodomänen außerhalb der BET-Familie gibt.

Werden zunächst die Affinitäten der einzelnen Verbindungen der *o*-Cl-JQ1-Analoga betrachtet, so fällt bei der Verbindung **42** ohne Benzylgruppe, wie bei dem äquivalenten *p*-Cl-JQ1-Analogen, auf, dass die Affinität etwas verringert ist. Auch der *para*-Iodbenzylrest in Struktur **44b** vermindert die Affinität. Die Reduktion der Affinität ließ sich auch bei dem äquivalenten *p*-Cl-JQ1-Analogen **43b** mit *para*-Iodbenzylrest erkennen. Alle anderen Verbindungen aus der *o*-Cl-JQ1-Reihe weisen sehr ähnliche Affinitäten auf.

Um die Selektivitäten zwischen der ersten und der zweiten Bromodomäne der einzelnen Proteine genauer betrachten zu können, wurde folgende Berechnung durchgeführt: ($\Delta\Delta T_m = \Delta T_m(BD2) - \Delta T_m(BD1)$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. So lässt sich erkennen, dass alle acht Verbindungen der *p*-Cl-JQ1-Reihe ähnliche Selektivitäten für die verschiedenen Bromodomänen aufweisen. Für die BRD2(2) zeigen alle *p*-Cl-JQ1-Analoga eine gute Selektivität (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 2.6$ °C), die sich jedoch wegen des hohen Temperaturshifts auch bei der BRD2(1) relativiert. Alle *p*-Cl-JQ1-Analoga zeigen zudem fast gar keine Selektivität für die BRD3(2) (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 0.9$ °C) und BRD4(2) (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 0.2$ °C). Dafür weisen aber alle *p*-Cl-JQ1-Analoga eine hervorragende Selektivität für die BRD2(2) (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 5.3$ °C) auf.

R =								
	BRD2	BRD3	BRD4	BRDT	BRD2	BRD3	BRD4	BRDT
H (41/42)	2.4	1.5	0.2	4.6	2.5	2.1	1.8	4.4
<i>p</i> -MeO-benzyl (17/18)	2.6	0.8	0.5	5.8	3.6	3.4	3.7	7.1
<i>p</i> -Nitrobenzyl (43a/44a)	2.9	1.8	0.2	5.5	4.1	3.4	3.5	6.5
<i>p</i> -Iodobenzyl (43b/44b)	2.6	0.8	1.2	5.1	4.0	3.0	4.4	5.5
<i>m</i> -Chlorbenzyl (43c/44c)	2.5	0.4	0.3	4.8	4.0	3.4	4.0	7.0
<i>m</i> -MeO-benzy (43d/44d)	2.8	0.6	0.2	5.6	2.6	2.3	1.7	5.3
di-MeO-benzyl (43e/44e)	2.7	0.0	-0.4	5.7	2.9	2.1	1.7	6.0
tri-MeO-benzy (43f/44f)	1.9	1.1	-0.5	4.9	3.2	2.7	2.5	5.7
Mittelwerte	2.6	0.9	0.2	5.3	3.4	2.8	2.9	5.9

$\Delta\Delta T_m$ (°C)	
	<0
	0-2
	2-4
	4-6
	6-8

Tabelle 3.5: Um die Selektivitäten besser zu bestimmen, werden die Temperaturshifts der jeweils ersten Bromodomäne von der jeweils zweiten Bromodomäne abgezogen. Die linken vier Spalten zeigen die Temperaturdifferenzen der *p*-Cl-JQ1-Analoga und die rechten vier Spalten zeigen die Temperaturdifferenzen *o*-Cl-JQ1-Analoga.

Die acht Verbindungen der *o*-Cl-JQ1-Analoga weisen ebenfalls jeweils ähnliche Selektivitäten für die verschiedenen Bromodomänen auf. Für alle zweiten Bromodomänen zeigen die *o*-Cl-JQ1-Analoga allerdings deutlich höhere Selektivitäten als die *p*-Cl-JQ1-Analoga, vor allem für die BRD3(2) (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 2.8$ °C gegenüber $\Delta\Delta T_m = 0.9$ °C) und BRD4(2) (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 2.9$ °C gegenüber $\Delta\Delta T_m = 0.2$ °C). Aber auch bei der BRD2(2) (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 3.4$ °C gegenüber $\Delta\Delta T_m = 2.6$ °C) und der BRDT(2) (Mittelwert $\Delta\Delta T_m = 5.9$ °C gegenüber $\Delta\Delta T_m = 5.3$ °C) wird die Selektivität gegenüber der *p*-Cl-JQ1-Analoga leicht gesteigert. Die *o*-Cl-JQ1-Analoga besitzen dementsprechend hervorragende und noch nie zuvor mit strukturverwandten Verbindungen erreichte Werte für die Selektivität.

Die Selektivitäten an der BRDT sind bei allen *o*-Cl-JQ1-Analoga sehr hoch. Im Folgenden werden vor allem die Selektivitäten an der BRD2, BRD3 und BRD4 bei den *o*-Cl-JQ1-Analoga betrachtet. Bei den Verbindungen **42** ohne Benzylgruppe, **44d** mit *meta*-Methoxybenzylrest, **44e** mit Dimethoxybenzylrest und **44f** mit Trimethoxybenzylrest sind die Selektivitäten an der BRD2, BRD3 und BRD4 am geringsten ausgeprägt. Die am Benzylrest *para*-

methoxysubstituierte Verbindung **18** weist im Gegensatz zu den *meta*-methoxy-, dimethoxy-, und trimethoxysubstituierten Verbindungen (**44d**, **44e** und **44f**) deutlich erhöhte Selektivitäten auf. Auch die anderen beiden *para*-Substitutionen mit einer Nitrogruppe in Verbindung **44a** und einem Iodsubstituenten in Verbindung **44b** weisen gesteigerte Selektivitäten auf. Die *meta*-Chlorsubstitution des Benzylrestes in Struktur **44c** ist, im Gegensatz zur *meta*-Methoxysubstitution in Verbindung **44d**, in den Selektivitäten deutlich erhöht und ähnlich gut wie die *para*-Substitutionsmuster.

Werden zusammenfassend sowohl die Affinitäten als auch die Selektivitäten aller Verbindungen aus diesem Kapitel betrachtet, so wird deutlich, dass die *p*-Cl-JQ1-Analoga gegenüber den *o*-Cl-JQ1-Analoga eine deutliche höhere Affinität zeigen, jedoch auf Kosten der bedeutenderen Selektivitäten. Mit der Stoffklasse der *o*-Cl-JQ1-Analoga ist das Ziel der Einführung der Selektivität bei BRD3 und BRD4 und der Selektivitätssteigerung bei BRD2 und BRDT eindeutig erreicht worden.

Um für die nächste Syntheseplanung eine geeignete Leitstruktur zu definieren, werden die Strukturen der *o*-Cl-JQ1-Analoga mit ähnlich hohen Selektivitäten, wie die *para*-methoxybenzylsubstituierte **18**, *para*-nitrobenzylsubstituierte **44a**, *para*-iodbenzylsubstituierte **44b** und *meta*-chlorbenzylsubstituierte **44c**, noch einmal genauer betrachtet. Hier ist zu erkennen, dass bei der *para*-iodbenzylsubstitution in Struktur **44b** eine starke Verringerung der Affinität eintrat. So wurde **44b** als Leitstruktur nicht weiter in Betracht gezogen. Die Nitrogruppe ist auf Grund der zu erwartenden reduktiven Biotransformation, bei welcher toxische Metabolite entstehen können, problematisch.^[123] Daher wird auch **44a** als Leitstruktur ausgeschlossen. Da schon gute Syntheseerfahrungen mit *para*-methoxybenzylsubstituierten Triazolothienotriazepinen vorhanden waren, wurde **18** als Leitstruktur für die nächsten Synthesen verwendet. Für den Fall, dass sehr gute Ergebnisse mit den neuen Strukturen erzielt werden, könnten mit dem Verbleib einer PMB-Schutzgruppe auch noch einmal nachträglich andere (Benzyl-)Reste in einem zweistufigen Entschützungs-/N-Alkylierungsverfahren eingeführt werden.

3.3.5 Vergleich der JQ1-Analoga mit analog substituierten Triazolobenzotriazepinen

Um den Unterschied der durch *Thermal Shift Assays* erhaltenen Ergebnisse zwischen ähnlichen Strukturen der „alten“ Triazolobenzotriazepine und „neuen“ *o*-Cl-JQ1-Analoga zu zeigen, wird hier auf vier Verbindungen aus der so genannten „Dichlorserie“ (Abb. 3.9) aus der Arbeit von M. Wrobel^[93] zurückgegriffen. Die Verbindungen der „Dichlorserie“ tragen an Position 8 des Triazolobenzotriazepins sowie am Phenylring in *ortho*-Position einen Chlorsubstituenten. Diese Serie weist dieselben Benzylreste auf wie die gezeigten *o*-Cl-JQ1-Analoga. Der einzige Unterschied besteht demnach im Thiophen- bzw. Chlorbenzen-Strukturelement. Die Affinität der Inhibitoren der „Dichlorserie“ war laut *Thermal Shift Assay* im Gegensatz zu den *o*-Cl-JQ1-Analoga nicht hoch (Tabelle 3.6). Anhand dieses Beispiels lässt sich zeigen, dass die Einführung des Thiophenrings zu einer deutlichen Erhöhung der Affinität führt. Jedoch ist bei der „Dichlorserie“ auch eine gewisse Selektivität zu erkennen, da bei allen Verbindungen der Temperaturshift bei der BRD2/3/4(2) jeweils deutlich höher ausfällt als bei den entsprechenden BRD2/3/4(1). Allerdings ist die Temperaturdifferenz bei den *o*-Cl-JQ1-Analoga von BRD2/3/4(2) jeweils noch höher als bei den entsprechenden BRD2/3/4(1). Ferner weisen die Triazolobenzotriazepine der „Dichlorserie“ kaum Affinität zur BRDT(2) auf. Eine nennenswerte Affinität zu BRDT(2) wird erst mit den *o*-Cl-JQ1-Analoga erreicht, und das auch noch verbunden mit einer äußerst hohen Selektivität für die BRDT(2) im Vergleich zur BRDT(1).

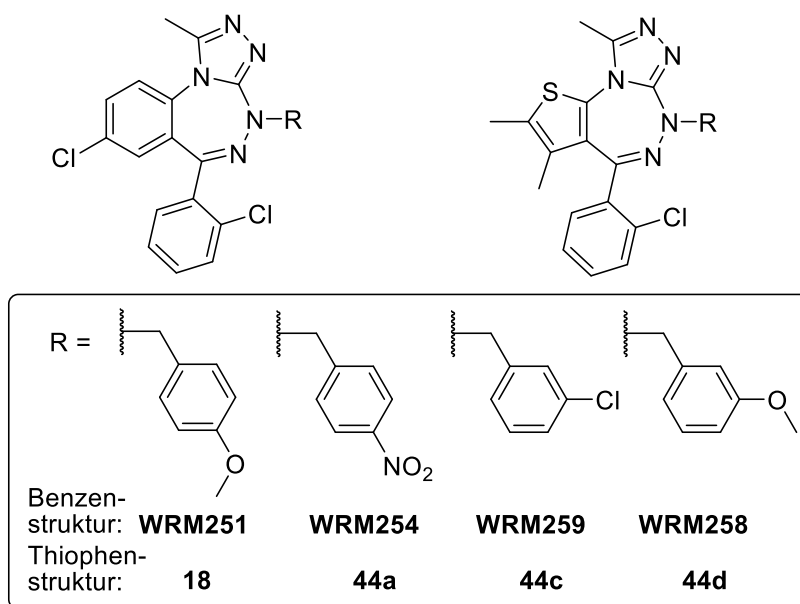


Abbildung 3.9: „Dichlorserie“ aus der Dissertation von M. Wrobel und vergleichbare *o*-Cl-JQ1-Analoga.

	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	LOC93349	PB1(5)	PCAF
WRM251	-0.2	2.9	0.8	2.8	0.3	3.7	-0.7	0.3	0.1	-0.4	0.6	-0.1	-0.1
WRM254	-0.6	3.0	0.4	2.1	0.6	3.8	-0.1	2.5	0.0	-0.5	-1.0	0.5	-0.1
WRM259	-0.4	3.1	-0.3	2.3	-0.2	4.1	-1.9	1.5	0.8	-1.1	-1.0	0.0	0.2
WRM258	0.6	4.8	0.9	4.7	1.5	5.3	0.0	2.7	0.1	-0.5	-1.2	-0.6	-0.3

	ΔT_m (°C)
	<0
	0-2
	2-4
	4-6
	6-8
	>8

18	2.1	5.7	3.3	6.7	3.7	7.3	0.6	7.7	-0.2	-0.8		-0.2	0.0
44a	2.0	6.2	3.3	6.7	3.5	7.0	0.6	7.1	0.0	-1.3		-0.2	-0.2
44c	2.1	6.1	3.5	7.0	3.4	7.4	0.4	7.4	-0.5	-2.7		-0.7	-0.5
44d	2.8	5.4	4.2	6.5	4.4	6.1	1.1	6.4	-0.1	-1.3		-0.2	0.1

Tabelle 3.6: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* für den Vergleich von Triazolobenzotriazepinen (oben) mit den *o*-Cl-JQ1-Analoga (unten). Die grauen Kästchen bedeuten, dass der Inhibitor nicht gegen die entsprechende Bromodomäne gescreent wurde. Eine deutliche Erhöhung der Affinität wird bei allen *o*-Cl-JQ1-Analoga gegenüber den Triazolobenzotriazepinen beobachtet, was zu dem Schluss führt, dass Thiophenringe gegenüber den Benzenringen in diesen Verbindungen die Affinität zu Bromodomänen steigern.

3.4 Formulierung eines neuen Zielmoleküls durch Kombination der Ergebnisse aus den Serien der JQ1-Analoga und der Triazolobenzotriazepine

Aus den vorangegangenen Kapiteln 3.1.1, 3.2.6 und 3.3.4 - 3.3.5 ließen sich verschiedene Schlüsse zur Strukturoptimierung ziehen, die im letzten Abschnitt der Arbeit Anwendung finden sollen.

So wurde in den ersten beiden Testreihen der Triazolobenzotriazepine festgestellt, dass polare, vor allem stickstoffhaltige Substituenten an C-8 und C-9, die in den ZA-Tunnel hineinreichen und dort Wasserstoffbrücken ausbilden können, zu einer Verbesserung der Affinität der Inhibitoren führen (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.2.6). Aus sterischen Gründen werden in Position 9 aber nur sehr kleine Substituenten toleriert, während in Position 8 auch voluminösere Reste zu einer Erhöhung der Affinität führen.

Die Testergebnisse aus den JQ1-Analoga zeigten, dass erstens die *para*-Methoxysubstitution am Benzylrest der Verbindung **18**, die als Leitstruktur dient, zu den besten Affinitäten führt, zweitens die *ortho*-Chlorsubstitution am Phenylring bessere Selektivitäten erreicht, und drittens der Thiophenring Vorteile gegenüber dem Benzenring hat, da die Affinität hierdurch noch weiter gesteigert werden konnte (siehe Kapitel 3.3.4 - 3.3.5).

Eine auf Basis all dieser Ergebnisse entworfene, neue Zielverbindung sollte somit einen Thiophenring enthalten, der mit polaren Resten, wie z.B. Aminen oder Harnstoffen, in Position 2 substituiert ist (Abb.3.10). An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Nummerierung der Lokanten bei Triazolobenzotriazepinen und Triazolothienotriazepinen unterschiedlich ist, da bei Triazolothienotriazepinen die Nummerierung am Schwefelatom beginnt. Legt man beide Grundkörperstrukturen übereinander, so liegt die Position 2 in Triazolothienotriazepinen zwischen den Positionen 8 und 9 der Triazolobenzotriazepine. Zudem sollte die neue Zielstruktur in Position 4 einen *ortho*-Chlorphenylrest aufweisen und einen *para*-Methoxybenzylrest an N-6.

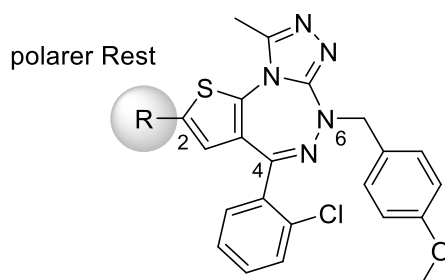


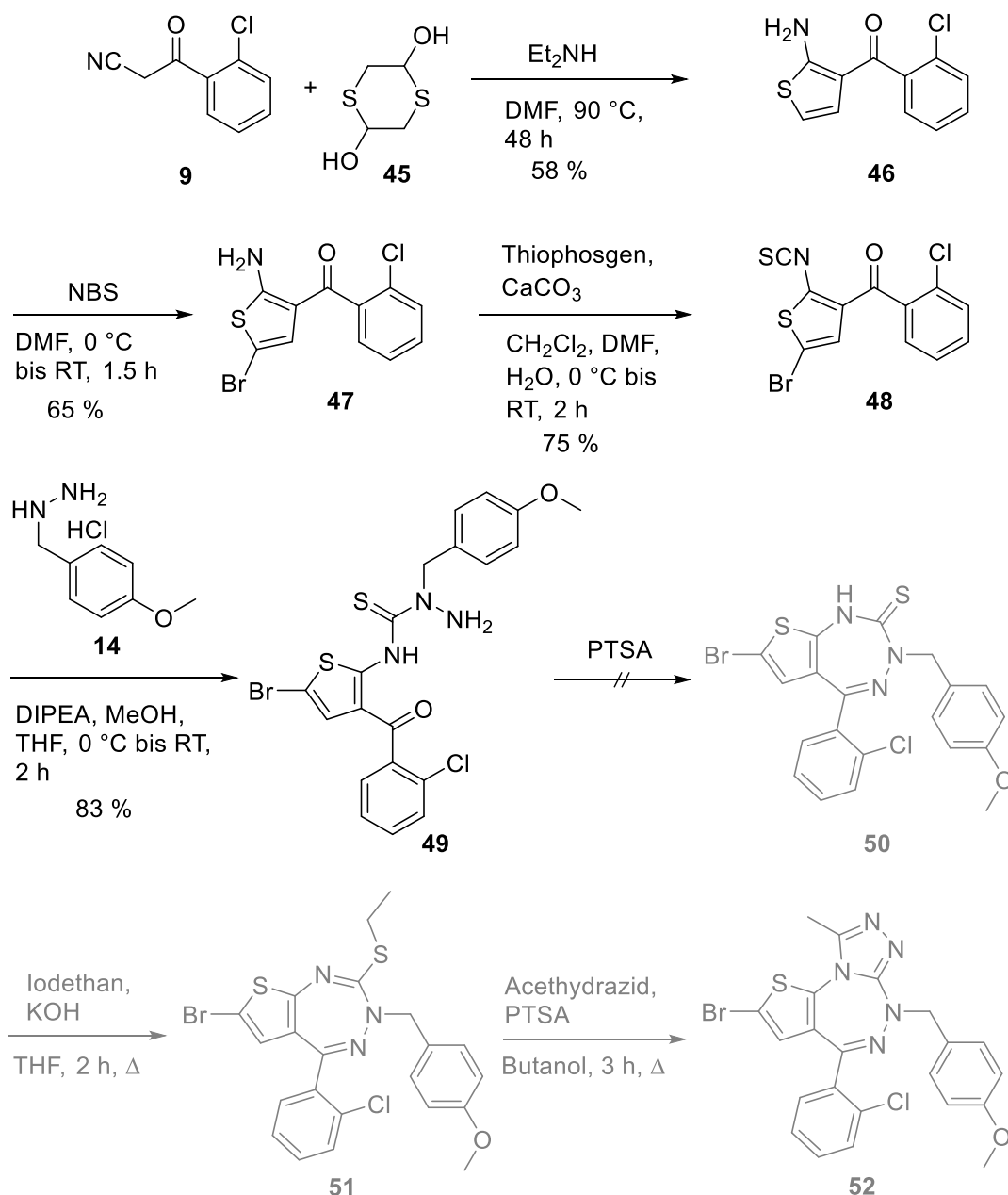
Abbildung 3.10: Die neue Zielstruktur mit polaren Resten R an C-2. Als Vorstufe hierfür bot sich die entsprechende Bromverbindung **52** (R = Br) an.

Um diesen Typ von Zielverbindungen zu erhalten, wurde eine Modifikationsmöglichkeit am C-2 des Thiophenrings benötigt. Als variables Intermediat bot sich eine Verbindung an, die in Position 2 einen Bromsubstituenten trägt, da dieser durch geeignete Folgereaktionen leicht in andere interessante Substituenten zu überführen sein sollte.

3.4.1 Versuche zur Synthese des 2-Bromtriazolothienotriazepins **52**

Mittels einer modifizierten Gewalt-Reaktion^[100] sollte zunächst das an C-4 und C-5 unsubstituierte 2-Amino-3-benzoylthiophen **46** hergestellt werden. An C-5 des Aminothiophens **46** sollte anschließend mit *N*-Bromsuccinimid ein Bromsubstituent eingeführt werden (Schema 3.21). Die weitere Synthese zur Herstellung des 2-Bromtriazolothienotriazepins **52** sollte angelehnt an die schon von uns etablierte Synthese der Triazolothienotriazepine durchgeführt werden. Die Überführung des Bromsubstituenten in die besonders attraktiven stickstoffhaltigen Substituenten könnte, wie schon in Kapitel 3.2.3.2 aufgezeigt, anschließend über die Kupfer-katalysierte Aminierung mit Trimethylsilylazid nach T. Maejima *et al.*^[110] oder eine Palladium-katalysierte Hartwig-Buchwald-Amidierung^[107] erfolgen.

Die Synthese des an C-4 und C-5 unsubstituierten 2-Amino-3-benzoylthiophens **46** gelang mit Hilfe der modifizierten Gewalt-Reaktion nach einer Methode von C. E. Tranberg *et al.*^[124], bei der jeweils ein Äquivalent 2-Chlorbenzoylchlorid und Diethylamin sowie ein halbes Äquivalent 2,5-Dihydroxy-1,4-dithian (**45**) in *N,N*-Dimethylformamid umgesetzt werden. Ein Äquivalent 2,5-Dihydroxy-1,4-dithian setzt bei Kontakt mit Aminen *in situ* zwei Äquivalente Mercaptoacetaldehyd frei.^[125] Die Suspension wurde 48 h auf 90 °C erwärmt und eine Ausbeute von 58 % der schon literaturbekannten, aber auf anderem Weg dargestellten Verbindung **46**^[126] erhalten. Die Bromierung an Position 5 des 2-Amino-3-benzoylthiophens **46** gelang mittels *N*-Bromsuccinimid in *N,N*-Dimethylformamid bei 0 °C bis Raumtemperatur in 1.5 h mit einer Ausbeute von 65 %. Hierbei sollte erwähnt werden, dass das Produkt **47** in Lösung nur kurze Zeit stabil ist. Die Zersetzung wird durch Wärme und Licht noch beschleunigt.



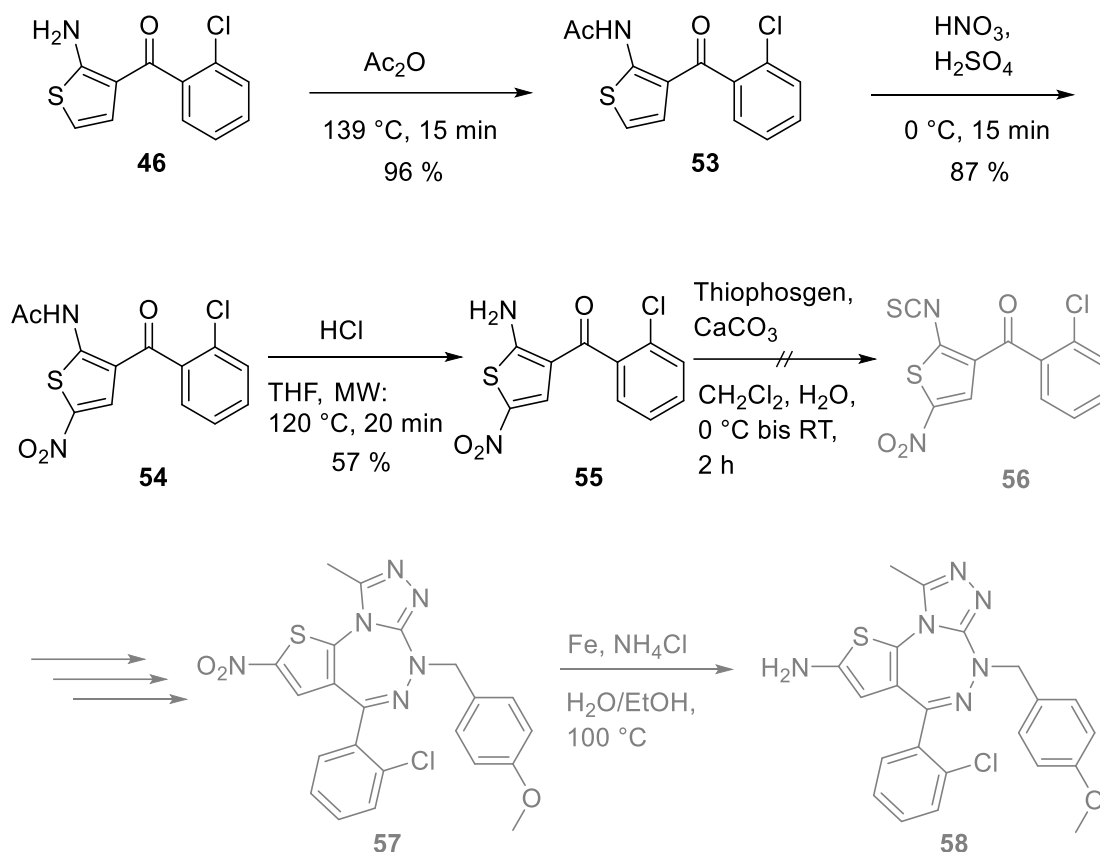
Schema 3.21: Erfolgreicher Ansatz zur Synthese des 2-Bromotriazolothienotriazepins **52**.

Die Synthese des Isothiocyanats **48** mittels eines Überschusses an Thiophosgen gelang mit der bewährten, von P. Richter *et al.*^[97] entwickelten Methode. Auch diese Verbindung **48** ist äußerst instabil und wurde daher umgehend mit einem kleinen Überschuss 4-Methoxybenzylhydrazin umgesetzt. Das offenkettige Produkt **49** wurde in einer Ausbeute von 83 % isoliert. Leider gelang es nicht, dieses Intermediat weiter zu dem Thienotriazepin **50** umzusetzen. Die etablierte Methode für derartige Ringschlüsse mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in siedendem Ethylacetat blieb erfolglos, wie auch weitere Versuche in anderen Lösungsmitteln. So blieb in niedrig siedenden Lösungsmitteln wie Ethylacetat und Tetrahydrofuran viel Edukt zurück, in höher siedenden Lösungsmitteln wie Toluol und

Dimethylsulfoxid zersetzte sich das Edukt. In der Hoffnung, ein reaktiveres Intermediat für einen Ringschluss bei niedrigeren Temperaturen zu generieren, wurde die offenkettige Verbindung **49** in Anlehnung an M. P. Cava *et al.*^[127] mit 1.2 Äquivalenten Lawessons Reagenz versetzt und in Toluol oder auch Tetrahydrofuran erwärmt. Hierbei sollte das Keton **49** zunächst in ein Thion überführt werden, welches dann die intramolekulare Kondensation mit der Hydrazingruppe eingehen sollte. Aber auch hier kam es nicht zur Bildung des gewünschten Produkts, sondern zur Zersetzung. Die offenkettige Verbindung **49** wurde in einem weiteren Versuch in Ethanol zusammen mit einem deutlichen Überschuss Essigsäure erhitzt, in der Hoffnung, dass eine Protonierung des Ketons zur Erleichterung des Ringschlusses führt. Aber weder dieser Ansatz noch die Verwendung von Lewisäuren wie Bortrifluorid-Etherat oder Scandiumtriflat, jeweils in trockenem Tetrahydrofuran, führten zu dem gewünschten Erfolg. Die Umsetzung der offenkettigen Verbindung **49** mit dem wasserziehenden Reagenz Orthoameisensäuretriethylester führte nur zu einer unerwünschten Reaktion, der *N*-Ethylierung der NH₂-Gruppe. Da ein Ringschluss an dieser Stelle, unter Beibehaltung des Bromsubstituenten, nicht zu bewerkstelligen war und zudem im weiteren Verlauf der Synthese (bei der Bildung des Triazolrings) wieder erhöhte Temperaturen verwendet werden müssten, wurde nach alternativen Synthesewegen gesucht.

3.4.2. Versuche zur Synthese des 2-Nitrotriazolothienotriazepins **57**

Eine möglicher alternativer Zugang zum 2-Aminotriazolothienotriazepin **58** könnte über ein 2-Nitrotriazolothienotriazepin **57** führen, welches anschließend nach einer schonenden Methode von S. C. Bell *et al.*^[101] mittels Eisen und Ammoniumchlorid zum primären Amin reduziert werden könnte (Schema 3.22). Hierzu sollte zunächst ein an C-5 nitriertes 2-Amino-3-benzoylthiophen **55** dargestellt werden, welches dann nach bekannten Methoden (vgl. Kapitel 3.4.1) zum 2-Nitrotriazolothienotriazepin **57** umgesetzt werden sollte.



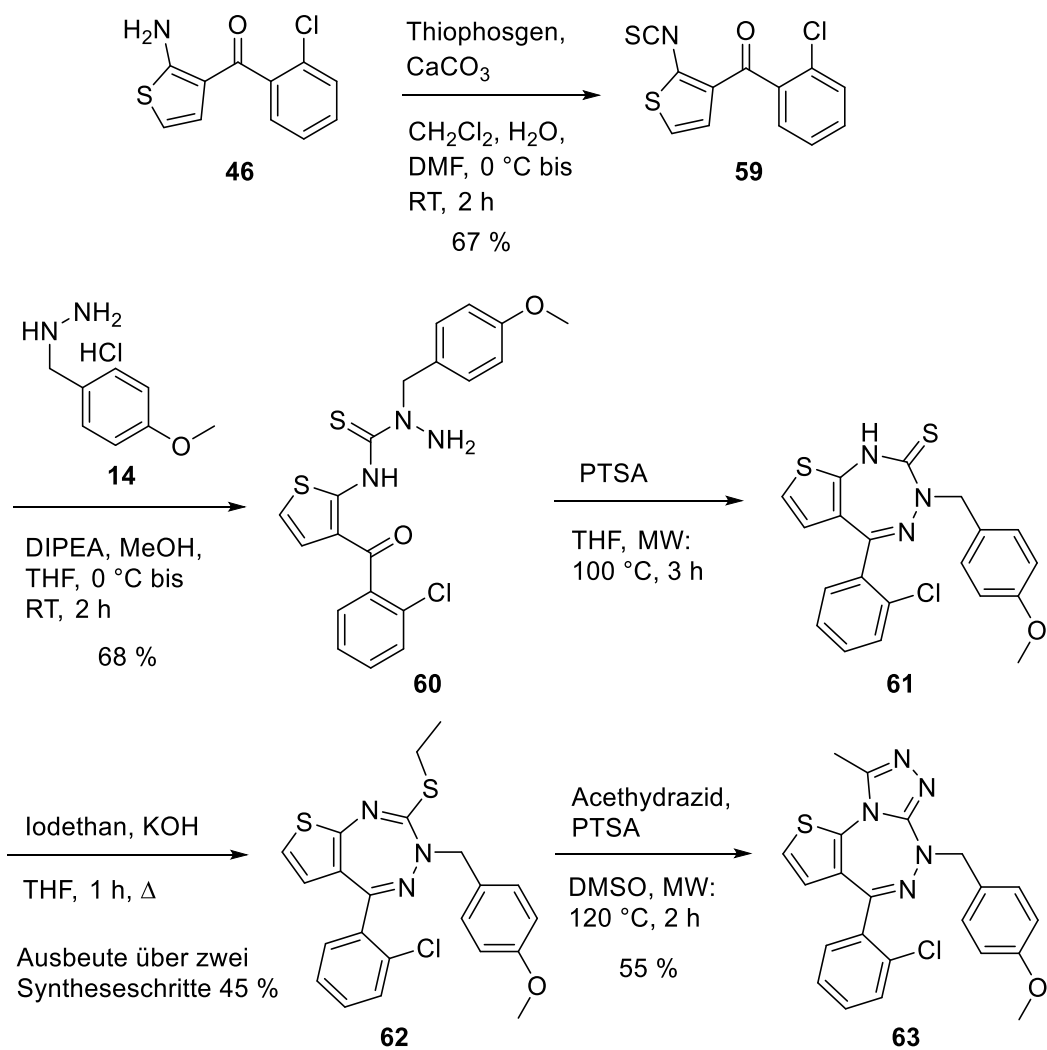
Schema 3.22: Erfolgreicher Ansatz zur Synthese des 2-Nitrothiazolobenzotriazepins **57**.

Um eine Nitrierung am 2-Aminothiophen **46**^[128] durchführen zu können, musste die Aminogruppe zunächst Acetyl-geschützt werden. Dies gelang durch Erhitzen der Verbindung **46** in Acetanhydrid in einer Ausbeute von 96 %. Die anschließende Nitrierung erfolgte in einer 1:1 Mischung aus 65 %iger Salpetersäure und 96 %iger Schwefelsäure bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ in guter Ausbeute von 87 %. Die Verbindung **54** wurde mit konzentrierter Salzsäure in Tetrahydrofuran entschützt. Dabei entstand das nitrierte 2-Aminothiophen **55** (Ausbeute 57 %). Die anschließende Reaktion mit Thiophosgen nach P. Richter *et al.*^[97] war leider nicht erfolgreich. Auch Varianten mit anderen Lösungsmitteln und in höher konzentrierten Lösungen blieben erfolglos. Auf Grund der Nitrogruppe am Thiophenring ist die Aminogruppe offensichtlich nicht mehr nukleophil genug, um mit dem Thiophosgen zum Isothiocyanat zu reagieren. Diese Syntheseroute konnte somit nicht weiterverfolgt werden.

3.4.3 Synthese des am Thiophenring unsubstituierten Triazolothienotriazepins

Um die Schwierigkeiten im Syntheseweg nach einer Bromierung oder Nitrierung am Thiophenring zu umgehen, sollte zuerst die Darstellung eines Triazolothienotriazepins mit an C-2 und C-3 unsubstituiertem Thiophenring erfolgen (Schema 3.23). Erst in einem späten Syntheseschritt sollte dann am Thiophenring bromiert bzw. nitriert werden oder auch weitere Reaktionen zur Funktionalisierung getestet werden.

Die Synthese startete mit der aus der modifizierten Gewalt-Reaktion erhaltenen Verbindung **46** (siehe Kapitel 3.4.1). Diese wurde mit Thiophosgen nach der Methode von P. Richter *et al.*^[97] zum Isothiocyanat **59** umgesetzt (Ausbeute 67 %) und anschließend, angelehnt an die Synthesestrategie von T. Nakamura *et al.*^[96], mit 4-Methoxybenzylhydrazin (**14**) versetzt. Die offenkettige Verbindung **60** fällt in dem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Tetrahydrofuran als brauner Feststoff aus. Nach Waschen mit Methanol wurden 68 % dieser Verbindung **60** erhalten. Der Ringschluss, welcher mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat katalysiert wird, erfolgt nur unter deutlich drastischeren Bedingungen als bei den Benzotriazepinen. Hierzu wurde die offenkettige Verbindung **60** im Mikrowellenreaktor 3 h bei 100 °C behandelt. Das Rohprodukt **61** wurde mit Iodethan zur Verbindung **62** S-ethyliert (Ausbeute 45 %). Der Aufbau des Triazolrings erfolgte angelehnt an M. Di Braccio *et al.*^[121] mit Acethydrazid unter *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat-Katalyse bei 120 °C unter Mikrowellenbestrahlung. Das an C-2 und C-3 unsubstituierte Triazolothienotriazepin **63** wurde dabei mit einer Ausbeute von 55 % erhalten.



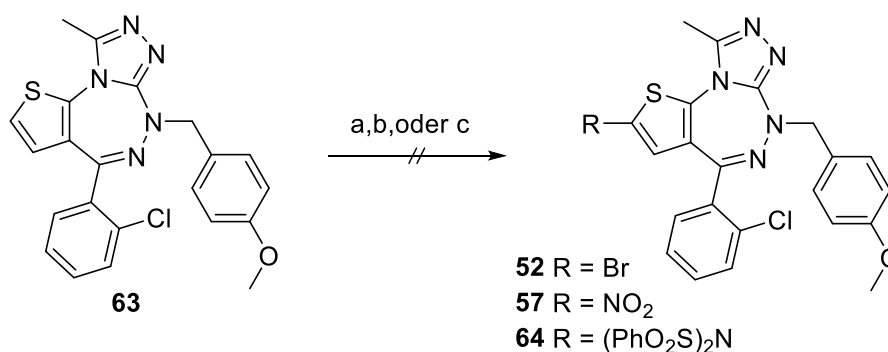
Schema 3.23: Synthese des an C-2 und C-3 unsubstituierten Triazolothienotriazepins **63**.

3.4.4 Versuche zur Einführung von Substituenten an C-2

An der S-alkylierten Zwischenstufe **62** sowie an dem Triazolothienotriazepin **63** wurden Versuche zur Bromierung, Nitrierung und Einführung anderer reaktiver Gruppen an C-2 des Thiophenrings unternommen (Schema 3.24 und 3.25).

Zur Bromierung der Verbindung **63** wurden verschiedene Ansätze mit *N*-Bromsuccinimid^[129] in Dimethylformamid durchgeführt (Schema 3.24). Aber alle Versuche, auch unter Zusatz von Essigsäure^[130] oder einer Lewisäure wie AlBr_3 ^[131] bei höheren oder niedrigeren Temperaturen blieben erfolglos. Auch mit Brom in Chloroform mit und ohne Essigsäure wurde kein anderes Ergebnis erzielt.

Bei der Umsetzung mit *N*-Bromsuccinimid und AlBr_3 in Dichlormethan wurde die PMB-Schutzgruppe an N-6 im geringen Maß abgespalten. Die resultierende Verbindung **89** (Abb.3.11) wurde vollständig charakterisiert und auch mittels *Thermal Shift Assay* getestet.

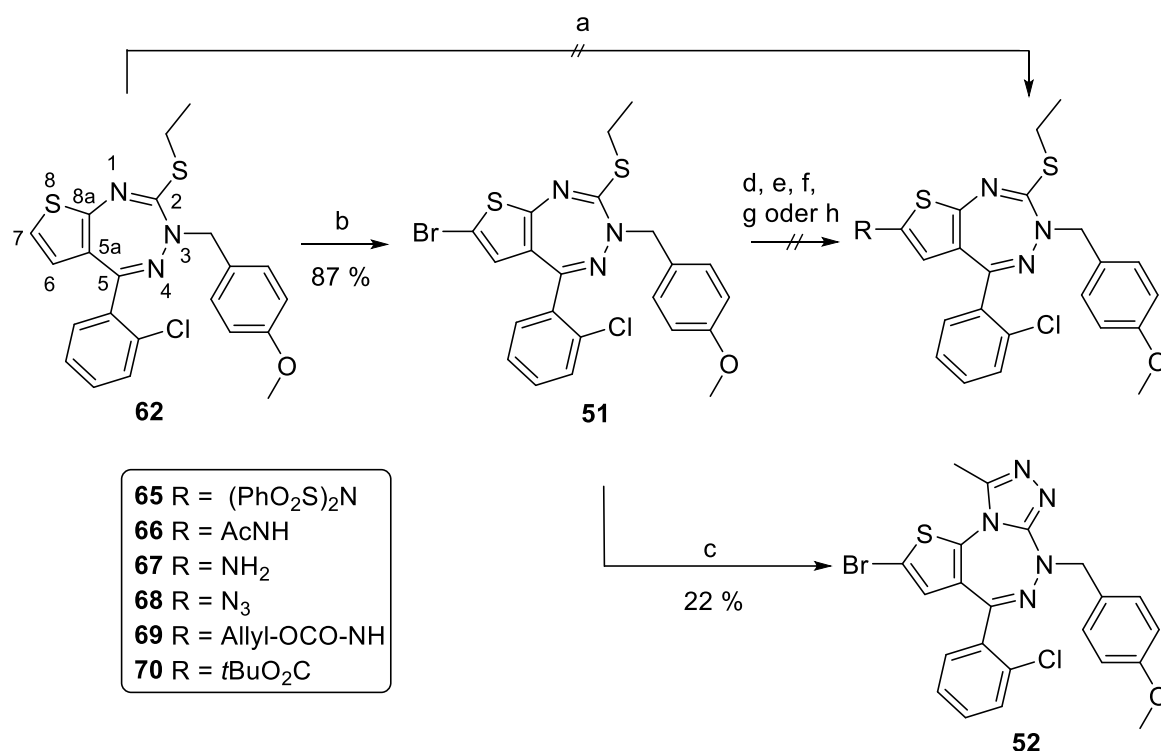


Schema 3.24: Erfolgreiche Versuche zur direkten Bromierung, Nitrierung bzw. Aminierung von **63**.
a) Bromierung zu **52**: NBS, DMF oder NBS, DMF, AcOH oder NBS, AlBr_3 , DCM oder Br_2 , CHCl_3 , AcOH jeweils bei verschiedenen Temperaturen und Reaktionszeiten; b) Nitrierung zu **57**: CAN, AcOH, 0 °C bis 50 °C, 12 h oder HNO_3 , H_2SO_4 , 0 °C, 15 min; c) C-N-Verknüpfung zu **64**: NFSI, CuI, DCE, 60 °C, 12 h.

Zur Nitrierung^[128] der Verbindung **63** wurde zunächst eine 1:1 Mischung aus konzentrierter Salpetersäure und konzentrierter Schwefelsäure bei 0 °C verwendet. Es kam dabei lediglich zu einer unerwünschten Nebenreaktion und zwar offensichtlich zur zweifachen Nitrierung der PMB-Gruppe, was sich im ¹H-NMR des Rohprodukts erkennen ließ. Ein Nitrierungsversuch in Anlehnung an eine Synthese von N. Ganguly *et al.*^[132] mit Cer(IV)-ammoniumnitrat (CAN) in Essigsäure führte bei verschiedenen Temperaturen (0 °C, RT, 50 °C) zu keiner Umsetzung.

Ein Versuch zur direkten Amidierung des Thiophens **63** mit *N*-Fluorbenzensulfonimid (NFSI) unter CuI-Katalyse^[133] in Dichlorethan führte zur Zersetzung des Edukts.

Da sich kein Erfolg bei der Substitution an C-2 des Triazolothienotriazepins **63** einstellte, wurden mit der S-alkylierten Vorstufe **62** weitere Reaktionen mit dem Ziel einer kontrollierten Funktionalisierung am Thiophenring durchgeführt (Schema 3.25).



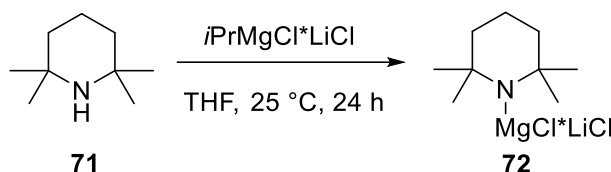
Schema 3.25: Umsetzungen von **62**. a) NFSI, CuI, DCE, 60 °C, 5 h; b) 1) 2.2 Äq. TMPMgCl*LiCl, THF, -25 °C, 1 h; 2) 3.6 Äq. Br₂; c) Acethydrazid, PTSA, DMSO, MW: 120 °C, 2.5 h; d) Acetamid, Pd₂(dba)₃, Xantphos, Cs₂CO₃, Dioxan, Δ; e) TMSN₃, Cu-Pulver, 2-Aminoethanol, DMA, Δ; f) NaN₃, DMSO, Δ; g) KOCN, CuI, *N,N*-Dimethylglycin, Allylalkohol, Δ; h) Mo(CO)₆, Pd(OAc)₂, Xantphos, *t*BuOH, DBU, DMF (MW).

So wurde zunächst auch hier die direkte Amidierung des Thiophens **62** mit *N*-Fluorbenzensulfonimid (NFSI) unter CuI-Katalyse^[133] in Dichlorethan getestet, die wiederum nicht zum Erfolg führte (Schema 3.25).

Jedoch konnte mit Hilfe einer Methode von F. M. Piller *et al.*^[134] mittels TMPMgCl*LiCl (**72**) die Verbindung **62** an Position 7 metalliert und die erhaltene Grignard-Verbindung anschließend mit Brom weiter umgesetzt werden. Das bromierte Produkt **51** wurde in einer sehr guten Ausbeute von 87 % erhalten. Eine analoge Metallierung wurde auch am Triazolothienotriazepin **63** getestet, führte aber, offensichtlich auf Grund der CH-Acidität der Methylgruppe am Triazolring, nicht zum gewünschten Erfolg.

Möglich war eine Metallierung an **62** auch mit verschiedenen anderen Verbindungen, wie den Organolithiumverbindungen *sec*-Butyllithium oder *tert*-Butyllithium oder dem Lithiumamid

Lithiumhexamethyldisilazid (LiHMDS). Mit der Knochel-Hauser Base $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ (**72**), welches eine Magnesiumamidbase ist, wurde jedoch die höchste Ausbeute der Bromverbindung **51** erzielt.



Schema 3.26: Synthese der Knochel-Hauser-Base $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ (**72**) aus TMPH (**71**) und dem Turbo-Grignard $i\text{PrMgCl} \cdot \text{LiCl}$.^[135]

Für die Entwicklung von chemoselektiven, starken Basen wurden über Jahrzehnte größte Anstrengungen unternommen. Schon 1947 publizierte C. R. Hauser *et al.*^[136] eine wegweisende Arbeit zu Magnesiumamidbasen (R_2NMgX , bzw. $(\text{R}_2\text{N})_2\text{Mg}$). Wegen der Aggregation dieser Magnesiumamide sind diese Verbindungen jedoch wenig löslich in Tetrahydrofuran. Durch Zusatz von Lithiumchlorid können Magnesiumamide jedoch solubilisiert werden, so dass eine deutlich bessere Löslichkeit in Tetrahydrofuran resultiert. Auf Grund der sterischen Hinderung der TMP-Base wird zudem eine Erhöhung der Regioselektivität bei der direkten Metallierung erreicht. Die $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ -Base (**72**) kann aus 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (TMPH) (**71**) und $i\text{PrMgCl} \cdot \text{LiCl}$ bei Raumtemperatur in Tetrahydrofuran hergestellt werden (Schema 3.26).^[135] Heutzutage ist diese Base Dank ihrer hohen Stabilität in Tetrahydrofuran auch käuflich zu erwerben.

Die Knochel-Hauser-Base (**72**) hat gegenüber den klassischen Organolithiumverbindungen viele Vorteile. So ist eine hohe Toleranz gegenüber vielfältigen organischen Funktionalitäten sowie eine erhöhte Regioselektivität vorhanden. Auch die Handhabung vereinfacht sich im Vergleich zu den Organolithiumverbindungen, da die Reaktionen bei moderaten Temperaturen von $-10\text{ }^\circ\text{C}$ bis $20\text{ }^\circ\text{C}$ gelingen.^[137]

Die dann noch erforderliche Anellierung des Triazolrings an die Verbindung **51** wurde zunächst klassisch mit Acethydrazid und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versucht, was aber zu dem fast schon erwarteten Ergebnis führte, dass im starken Ausmaß der Bromsubstituent von Verbindung **51** abgespalten wurde und so nur eine geringe Ausbeute von 22 % der Zielverbindung **52** erhalten wurde (Schema 3.25). Die 2-Bromthiophenverbindung ist nach wie vor licht- und wärmelabil. Da noch einige weitere Syntheseschritte nach der Anellierung folgen müssten und diese Anellierung nach mehreren Optimierungsversuchen nie mehr als 22 % Ausbeute ergab, erschien diese Syntheseroute wenig attraktiv, um die Zielverbindungen zu erhalten.

Daher wurde weiter nach Methoden recherchiert, die es ermöglichten, an dem Thienotriazepin **51** an Position 7 einen Stickstoffsubstituenten einzuführen. Versuche zur Amidierung in Anlehnung an eine Methode von J. Yin *et al.*^[107] nach Hartwig-Buchwald mit Acetamid und Pd₂(dba)₃ als Katalysator sowie Xanthphos als Ligand führten nicht zur gewünschten Umsetzung, da bei tiefen Temperaturen das Edukt unverändert blieb und bei höheren Temperaturen überwiegend der Bromsubstituent von **51** abgespalten wurde (Schema 3.25). Auch die Voraktivierung des Palladium-Katalysators in Anlehnung an eine Vorschrift von B. Fors *et al.*^[138] mit Pd(OAc)₂, X-Phos als Ligand sowie Wasser und weitere Umsetzung der bromierten Verbindung **51** bei niedrigeren Temperaturen führte nicht zu dem gewünschten Erfolg. Die Umsetzung von **51** mit Trimethylsilylazid und Kupferpulver nach T. Maejima *et al.*^[110] führte ebenfalls überwiegend zum Verlust des Bromsubstituenten und nicht zu dem gewünschten 7-Aminothienotriazepin **67** (Schema 3.25). Ein Versuch zur direkten Umsetzung von **51** mit Natriumazid^[139] zum 7-Azidothienotriazepin **68** blieb ebenfalls erfolglos. Auch die Umsetzung mit Kaliumcyanat^[140], CuI-Katalysator und *N,N*-Dimethylglycin als Ligand in Allylalkohol führte nur zur Zersetzung der bromierten Verbindung **51** und nicht zur Bildung des angestrebten Allylcarbamats **69**.

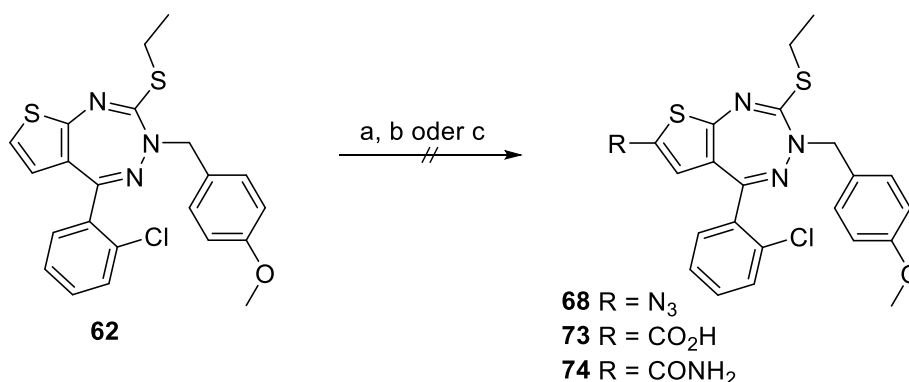
Da alle Versuche fehlgeschlagen waren, die bromierte Verbindung **51** zu einem Produkt umzusetzen, das bereits die anvisierte C-N-Bindung aufweist, wurde der Plan gefasst, zunächst eine Carboxylgruppe an Position 7 einzubringen, um anschließend mittels Umlagerungsreaktionen zu Stickstoffsubstituenten zu gelangen. Aus der bromierten Verbindung **51** sollte in Anlehnung an eine Vorschrift von L. R. Odell *et al.*^[141] mit Mo(CO)₆, *tert*-Butanol, Pd(OAc)₂, Xanthphos, Diazabicycloundecen (DBU) und Dimethylformamid im Mikrowellenreaktor ein *tert*-Butylester **70** entstehen (Schema 3.25). Dieser Versuch blieb jedoch ebenfalls erfolglos.

Daher wurden die Versuche, über Bromthiophen-Zwischenstufen zu den Zielverbindungen mit stickstoffhaltigen Substituenten an C-2 von Triazolothienotriazepinen zu kommen, eingestellt.

3.4.5 Direkte Metallierung von **62** mit starken Basen und weitere Umsetzung zu Triazolothienotriazepin-2-carbonsäure **77**

Da sich Carbonsäurederivate auch aus metallorganischen Verbindungen aufbauen lassen, war es naheliegend, am Thiophenring durch direkte Metallierung mit $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ eine Grignardverbindung, bzw. durch Lithiierung mit Lithiumalkylen oder Lithiumamiden wie LiHMDS , ein lithiumorganisches Intermediat herzustellen (vgl. Kapitel 3.4.4) und diese mit geeigneten Elektrophilen umzusetzen (Schema 3.27).

Ein Versuch zur Lithiierung von **62** und anschließenden Umsetzung mit CO_2 zur Thienotriazepin-7-carbonsäure **73** verlief ergebnislos, ebenso die Reaktion des lithiierten Intermediats mit Trimethylsilylisocyanat^[142], welche das Thienotriazepin-7-carboxamid **74** zum Ziel hatte. Auch der Versuch zur Synthese des Azids **68** aus dem magnesiierten Thienotriazepin und Tosylazid^[143] blieb ohne Erfolg. Die Lithiierung lief bei allen beschriebenen Versuchen eindeutig erfolgreich ab. Vor Zugabe des jeweiligen Elektrophils wurde bei jedem Ansatz ein Tropfen der Lösung entnommen und mit elementarem Iod oder Brom gequenchet. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ließ sich so am typischen R_f -Wert der ringhalogenierten Produkte erkennen, ob die Lithiierung erfolgreich war.

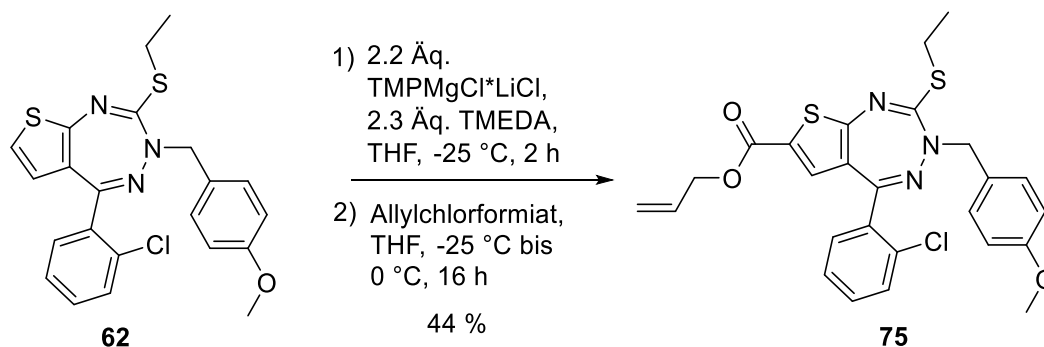


Schema 3.27: Metallierung und weitere Umsetzung von **62**. a) 2.2 Äq. $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$, 2.3 Äq. TMEDA, THF, $-25\text{ }^\circ\text{C}$ 60 min, 2) 3.6 Äq TsN_3 , 40 min 3) $\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2$ in H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$ 12 h; b) 1) 2 Äq. sec-BuLi , THF, $-90\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, 2) CO_2 ; c) 1) 1.5 Äq sec-BuLi , 1.6 Äq TMEDA, THF, $-90\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min, 2) 3 Äq. TMSNCO .

Daraufhin wurde eine literaturbekannte Umsetzung von magnesiierten Thiophenverbindungen mit Säurechloriden^[134] zur Umsetzung des Thiophengrignards mit Chlorformiaten weiterentwickelt.

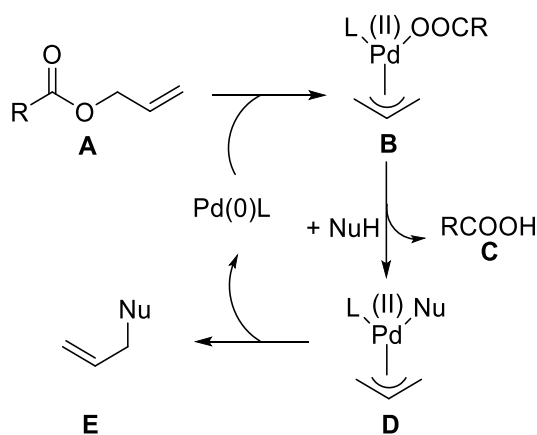
Die Umsetzung mit Allylchlorformiat brachte den ersehnten Erfolg (Schema 3.28). Der Allylester **75** konnte in einer Ausbeute von 44 % erhalten werden. Diese Umsetzung gelang

nach direkter Metallierung von **62** mit *sec*-Butyllithium^[144], in einer verbesserten Varianten auch mit der Base $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ ^[134], allerdings nur mit Zusatz von 2.3 Äquivalenten Tetramethylethylendiamin (TMEDA), welches als Deaggregationsadditiv^[145] fungiert.



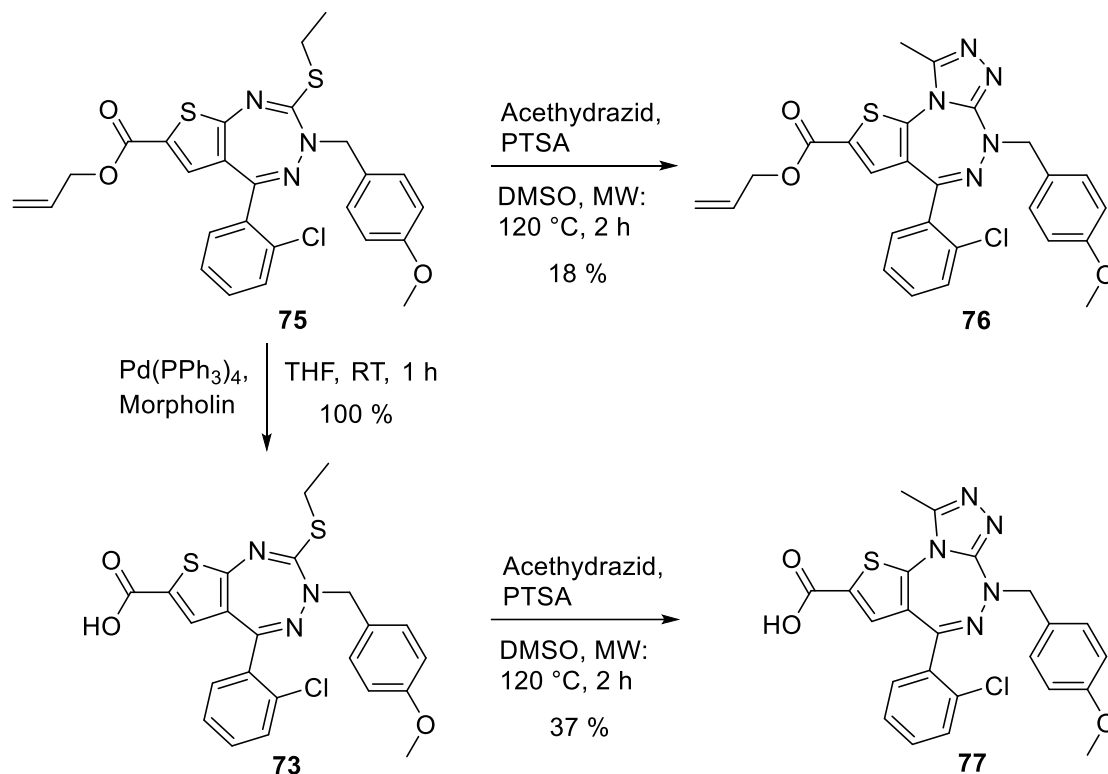
Schema 3.28: Direkte Magnesierung von **62** mit $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ und Umsetzung mit Allylchlorformiat zum Allylester **75**.

Der Aufbau des Triazolrings aus dem Allylester **75** mit Acethydrazid und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zum Trizyklus **76** gelang nur in einer niedrigen Ausbeute von 18 %, da es zu Nebenreaktionen des Hydrazids mit dem Ester kam. Daher wurde die Estergruppe zunächst zur Carbonsäure gespalten (Schema 3.30). Die Abspaltung der Allylschutzgruppe erfolgte in quantitativer Ausbeute mit Hilfe einer sehr milden Methode, welche von H. Kunz *et al.*^[146] erstmals beschrieben wurde (Schema 3.29).



Schema 3.29: Entschützung der Carbonsäure durch Palladium-katalysierten Allyltransfer mit Hilfe der Tsuji-Trost-Reaktion. Der Allylrest bildet unter oxidativer Addition des Palladiums einen π -Allyl-Palladiumkomplex **A**. Nach Ligandenaustausch der entsprechenden Carbonsäure **B** gegen ein Nukleophil, erfolgt eine reduktive Eliminierung und somit ein irreversibler Transfer des Allylrestes auf das Nukleophil.

Bei dieser Methode wird mittels des Palladiumkatalysators $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ der Allylrest irreversibel auf den Stickstoff von Morpholin transferiert. Eine anschließende Kondensation der Verbindung **73** mit Acethydrazid und Cyclisierung mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zum Produkt **77** verlief mit einer akzeptablen Ausbeute von 37 %.



Schema 3.30: Synthese des Triazolothienotriazepin-2-carbonsäure **77**.

3.4.6 Einführung eines Stickstoffsubstituenten an C-2 mittels Umlagerungsreaktionen

Die Carbonsäure **77** eröffnete die Möglichkeit, mit Hilfe verschiedener Umlagerungsreaktionen zu den gewünschten Zielverbindungen wie Aminen, Amiden, Carbamaten oder auch Harnstoffen zu gelangen.

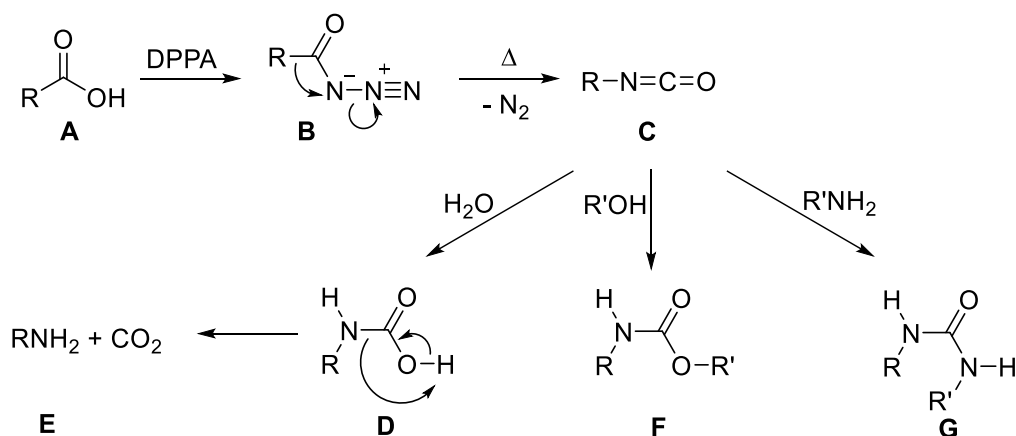
Wird die Carbonsäure **77** zunächst mit Thionylchlorid und Ammoniak umgesetzt, so könnte ein primäres Säureamid^[147] erhalten werden, welches in einer Hofmann-Umlagerung^[148] unter Einwirkung von Brom und einer Base die Darstellung eines primären Amins ermöglichen sollte.

Da die Hofmann-Umlagerung jedoch erfordert, dass aus der Carbonsäure zunächst über das Säurechlorid ein Säureamid hergestellt wird, wurden elegantere Alternativen in Betracht gezogen. Mit modernen Varianten der Schmidt- und auch der Curtius-Umlagerung können

Carbonsäuren in einem Arbeitsgang in primäre Amine oder Harnstoffe umgewandelt werden.^[149]

Mit der Schmidt-Umlagerung lassen sich Carbonsäuren in einem Arbeitsgang zu Aminen umsetzen, jedoch verbunden mit dem Nachteil, dass drastische Bedingungen (Stickstoffwasserstoffsäure und eine weitere starke Mineralsäure, z. B. Schwefelsäure) benötigt werden und die Reaktion bei aromatischen Carbonsäuren (im Gegensatz zu aliphatischen) unbefriedigende Resultate liefert. Zudem ist die Handhabung von Stickstoffwasserstoffsäure gefährlich, da diese sehr giftig ist und bei Berührung mit warmen Gegenständen zur Explosion führen kann.^[149]

Bei der Curtius-Umlagerung wird zunächst die Carbonsäure **A** in ein Säureazid **B** überführt (Schema 3.31).^[150] Klassisch erfolgt dies durch Umsetzung der Carbonsäure mit Thionylchlorid in ein Säurechlorid, welches wiederum mit Natriumazid zum Säureazid **B** umgesetzt wird. Eine modernere Variante der Carbonsäureazid-Darstellung ermöglicht das Diphenylphosphorylazid^[151] (DPPA). DPPA hat den Vorteil, dass es unter sehr milden Bedingungen (Verwendung von Triethylamin als Base) Carbonsäuren direkt zu Carbonsäureaziden **B** umsetzt. Durch Erwärmen in einem inerten Lösungsmittel wird das Säureazid **B** unter Abspaltung von Stickstoff zu einem Isocyanat **C** umgelagert, das wahlweise mit Wasser zum Amin **E** hydrolysiert, mit Alkoholen zu den entsprechenden Carbamaten **F** oder mit Aminen zu Harnstoffen **G** umgesetzt werden kann.^[152]



Schema 3.31: Mechanismus der Curtius-Umlagerung. Ausgehend von einer Carbonsäure **A** über ein Carbonsäureazid **B** sowie ein Isocyanat **C** zum Amin **E**, Carbamat **F** oder Harnstoff **G**.

Da bei der Curtius-Umlagerung weder stark basische (wie bei der Hofmann-Umlagerung) noch stark saure Bedingungen (wie bei der Schmidt-Reaktion) benötigt werden und zudem eine hohe Variationsmöglichkeit bei der Umsetzung der intermediären Isocyanate besteht, wurde die Curtius-Umlagerung zur Synthese der Zielverbindungen bevorzugt.

Die Darstellung der Triazolothienotriazepin-2-carbonsäure **77** erforderte schon neun Syntheseschritte. Daher wurde die Curtius-Umlagerung zunächst an einem Testmolekül, der Benzothiophen-2-carbonsäure (**78**), getestet (Schema 3.32). Mit Hilfe der Curtius-Umlagerung werden verschiedene Produkte unter verschiedenen Synthesebedingungen hergestellt. Zunächst wurde nach einer Literaturvorschrift von I. A. Yule *et al.*^[153] das Säureazid **79** dargestellt und in Anlehnung an diese Vorschrift zum *tert*-Butylharnstoff **81** umgesetzt. Dazu wurde die Carbonsäure mit Thionylchlorid zum Säurechlorid umgesetzt. Mit Natriumazid konnte das Säureazid **79** dargestellt werden, welches anschließend wässrig aufgearbeitet wurde. Durch Erhitzen des Säureazids in Toluol wurde das Isocyanat erhalten, welches sich nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur mit *tert*-Butylamin zum *tert*-Butylharnstoff **81** umsetzen ließ (59 % Ausbeute).

Nach der gleichen Vorschrift wurde auch die Triazolothienotriazepincarbonsäure **77** umgesetzt, aber es wurde hier nicht der gewünschte *tert*-Butylharnstoff erhalten. Daher wurden noch weitere Reaktionen in Anlehnung an B. Ma *et al.*^[154] mit DPPA als Azidquelle getestet.

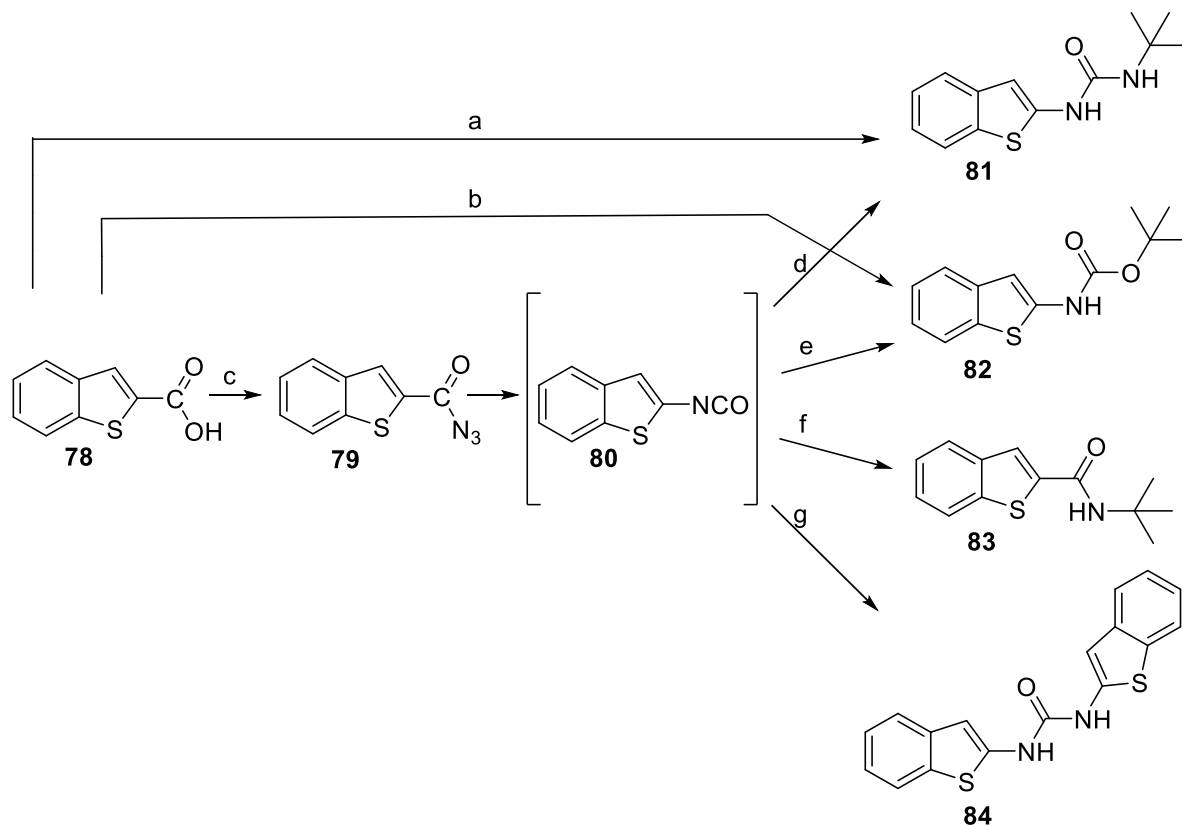
Mit dem Testmolekül **78** gelang die Umsetzung mittels DPPA zum Säureazid **79** sehr gut mit 99 % Ausbeute (Schema 3.32). Dieses Säureazid **79** wurde aufgereinigt, so dass überschüssiges Diphenylphosphorylazid sowie das entstandene Diphenylphosphat die Folgereaktionen nicht stören konnten.

So gelang in der Modellreaktion die Synthese des *tert*-Butylharnstoffs **81** mit 90 % Ausbeute. Dazu wurde zunächst das Säureazid **79** erhitzt, um das Isocyanat **80** zu erhalten und dann mit *tert*-Butylamin versetzt. Die Darstellung des *tert*-Butylcarbamats **82** gelang ebenfalls in fast quantitativer Ausbeute (98 % bis 100 %). Entweder wurde hierzu zunächst das Säureazid **79** hergestellt und aufgereinigt, dann wurde dieses erhitzt und anschließend mit *tert*-Butanol versetzt, alternativ wurde die Carbonsäure **78** noch vor Zugabe von DPPA mit *tert*-Butanol versetzt und ohne Isolierung des Azids **79** das Carbamat **82** erhalten.

Wurde zur Synthese des Harnstoffs dieselbe Methode wie bei der Synthese des Carbamats **82** mit *tert*-Butylamin anstelle des *tert*-Butanols eingesetzt, also das *tert*-Butylamin schon vor Zugabe des DPPA zur Carbonsäure **78** zugesetzt, so wurde nicht der Harnstoff **81**, sondern das *tert*-Butylamid **83** mit 80 % Ausbeute erhalten. Dies liegt daran, dass das Säureazid **79**, noch bevor es zum Isocyanat **80** reagieren kann, nukleophil vom *tert*-Butylamin angegriffen wird.

Wird das Säureazid **79** zum Isocyanat **80** umgelagert und anschließend zur Hydrolyse mit Wasser versetzt, wird nicht das erwartete Benzothiophen-2-amin, sondern der symmetrische Harnstoff **84** mit einer Ausbeute von 88 % erhalten. Dies ist eine bekannte Nebenreaktion und

lässt darauf schließen, dass zwischenzeitlich zwar das Benzothiophen-2-amin entsteht, dieses aber spontan mit verbliebenem Isocyanat **80** abreagiert. Verhindern ließe sich diese Nebenreaktion wahrscheinlich durch Zusatz von Natriumtrimethylsilanolat in Anlehnung an eine Methode von B. Ma *et al.*^[154]. Dies wurde jedoch nicht weiter getestet.

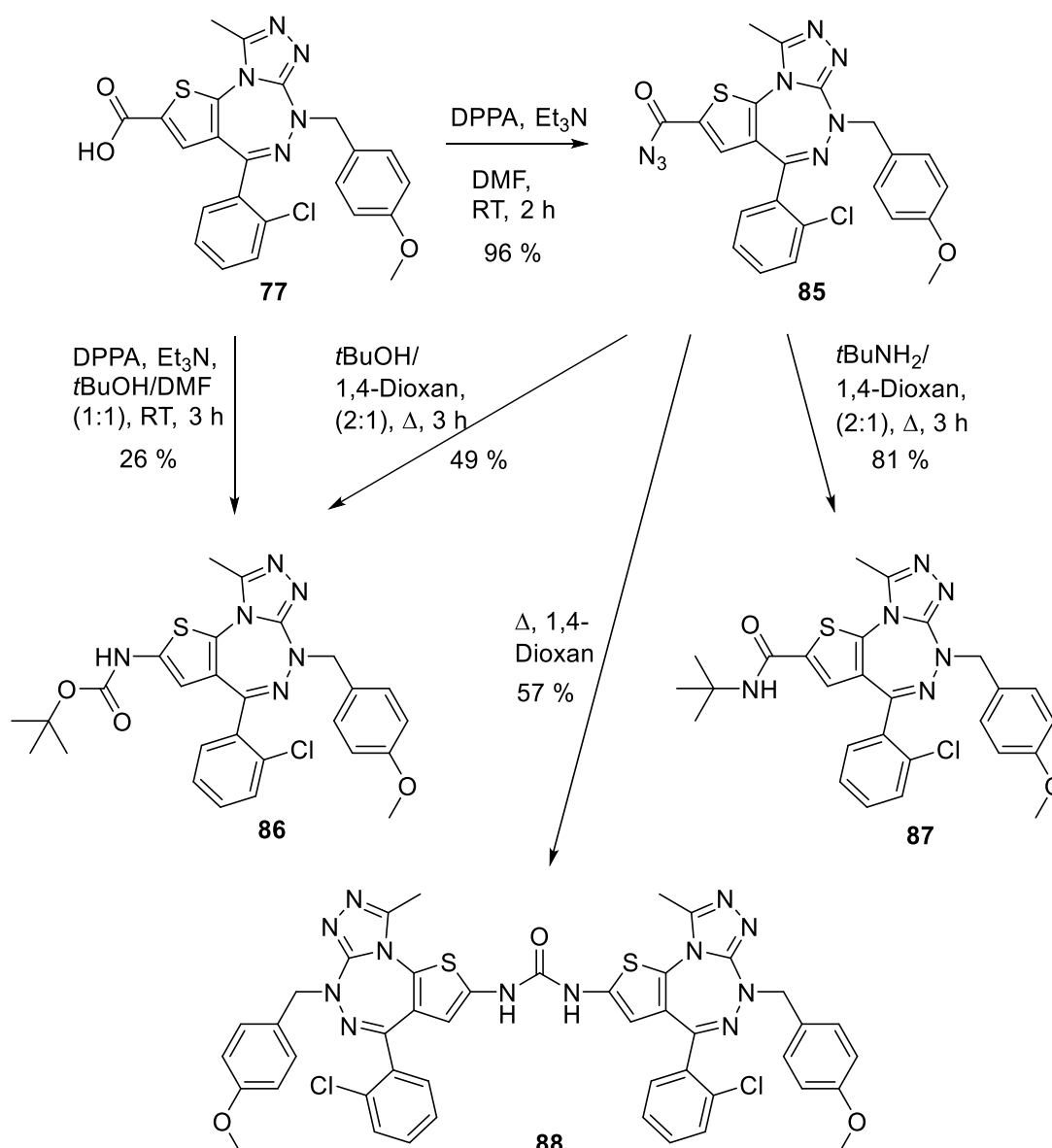


Schema 3.32: Mittels Curtius-Umlagerung wird aus dem Testmolekül Benzothiophen-2-carbonsäure **78** über ein Säureazid **79** sowie ein Isocyanat **80** ein Carbamat **82**, ein Amid **83** oder verschiedene Harnstoffe **81** und **84** synthetisiert. a) 1. SOCl_2 , kat. DMF, CH_2Cl_2 , 1 h, 65°C ; 2. NaN_3 , THF, H_2O (3:1), 0°C bis RT, 0.5 h; 3. Toluol, Δ , 2 h dann RT, $t\text{BuNH}_2$, 1 h (59 % **81**); b) $t\text{BuOH}$, DPPA, Et_3N , Δ , 4 h (98 % **82**) c) DPPA, Et_3N , DMF, RT, 2 h (99 % **79**); d) Toluol, Δ , 4 h, auf RT kühlen, $t\text{BuNH}_2$, 1 h (90 % **81**); e) $t\text{BuOH}$, Δ , 8 h (100 % **82**); f) $t\text{BuNH}_2$, 1,4-Dioxan (1:1), Δ , 1.5 h (80 % **83**); g) H_2O , 1,4-Dioxan, Δ , 1 h (88 % **84**).

Die am Testmolekül **78** erprobten Umlagerungsreaktionen lassen sich fast alle auf die Triazolothienotriazepin-2-carbonsäure **77** übertragen, allerdings fallen die Ausbeuten bei den komplexen Molekülen zum Teil niedriger aus.

Ähnlich wie das Testmolekül **78** ließ sich auch die Triazolothienotriazepin-2-carbonsäure **77** mittels DPPA mit einer sehr guten Ausbeute von 96 % zum Säureazid **85** umsetzen (Schema 3.33). Die weitere Umsetzung zum Carbamat **86** durch Erhitzen des Säureazids **85** in einer Mischung aus *tert*-Butanol und 1,4-Dioxan gelang mit einer Ausbeute von 49 %. Die Umsetzung der Carbonsäure **77** mit DPPA in *tert*-Butanol und *N,N*-Dimethylformamid ergab

das gleiche Carbamat **86** in einer Ausbeute von 29 %. Die Reaktion zum *tert*-Butylamid **87** durch Erhitzen des Säureazids **85** in einer Mischung aus *tert*-Butylamin und 1,4-Dioxan gelang mit einer Ausbeute von 81 %. Auch hier erfolgte der nukleophile Angriff des Amins am Carbonsäureazid schneller als die thermische Umlagerung. Die Darstellung des asymmetrischen *tert*-Butylharnstoffs konnte auch durch Variation der Reaktionsbedingungen nicht erreicht werden, da das Erhitzen des Säureazids **85** in verschiedenen Lösungsmitteln wie *N,N*-Dimethylformamid oder 1,4-Dioxan direkt mit einer Ausbeute von 57 % zum symmetrischen Harnstoff **88** führte, ohne dass sich zuvor das Isocyanat isolieren ließ. Weil nach Erhitzen und anschließendem Kühlen der Reaktionslösung, in der sich das Isocyanat befinden sollte, noch *tert*-Butylamin hinzugegeben wurde, wurde als Nebenprodukt außerdem noch das Amid **87** erhalten (15 % Ausbeute).



Schema 3.33: Mittels Curtius-Umlagerung lassen sich aus der Carbonsäure **77** über das Säureazid **85**, das Carbamat **86**, das Amid **87** und der symmetrische Harnstoff **88** darstellen.

3.4.7 Ergebnisse und Diskussion der Screenings der an C-2 substituierten Triazolothienotriazepine

Die Screenings der an C-2 substituierten Triazolothienotriazepine mittels *Thermal Shift Assays* erfolgten am SGC der Universität Oxford. Auch in dieser Testreihe wurde an jeweils acht Bromodomänen der BET-Familie (BRD2(1/2), BRD3(1/2), BRD4(1/2) und BRDT(1/2)) gescreent. Zudem wurde noch zur Abklärung der Selektivität an vier weiteren Bromodomänen (BAZ2B, CREBBP, PB1(5) und PCAF) getestet, die nicht der BET-Familie angehören, sondern jeweils aus unterschiedlichen Zweigen des phylogenetischen Baums der Bromodomänen stammen.

In dieser Testreihe (Tabelle 3.7) wurden nur bei wenigen Substanzen (Abb. 3.11) signifikante Temperaturshifts (mehr als 4 °C) gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Testung weisen darauf hin, dass die unscheinbaren Methylgruppen an C-2 und C-3 der JQ1-Analoga (siehe Kapitel 3.3.4) eine wichtige Rolle für die Affinität zu den Bromodomänen spielen. Verbindung **63** ist sehr gut vergleichbar mit der Leitstruktur **18** der *o*-Cl-Analoga, da bei **63** am Thiophenring nur die beiden Methylgruppen in Position 2 und 3 fehlen. Diese Strukturveränderung in **63** führt zu einem massiven Einbruch der Affinität, die auch nicht durch Substitution mit verschiedenen polaren Resten an C-2 wieder hergestellt werden kann. Verbindung **89**, welche keinen 4-Methoxybenzyl-Rest an N-6 aufweist, verliert, wie auch bei anderen Verbindungen der *o*- bzw. *p*-Cl-JQ1-Analoga ohne Benzylgruppe, zusätzlich deutlich an Affinität. Überraschend ist, dass sowohl die bromsubstituierte Verbindung **52** als auch der Allylester **76**, das Säureazid **85** und das Carbamat **86** praktisch keine Affinitäten zeigen. Bei dem symmetrischen Harnstoff **88** war der totale Verlust der Affinität auf Grund der Molekülgröße nicht überraschend. Die Carbonsäure **77** und das *tert*-Butylamid **87** weisen eine etwas höhere Affinität auf als die anderen an C-2 substituierten Verbindungen, jedoch geringere Affinitäten an den jeweils zweiten Bromodomänen als die Vergleichssubstanz **18**. Beide Verbindungen haben zudem gegenüber **18** deutlich an Selektivität verloren, vor allem bezüglich der BRD3(2) und der BRD4(2).

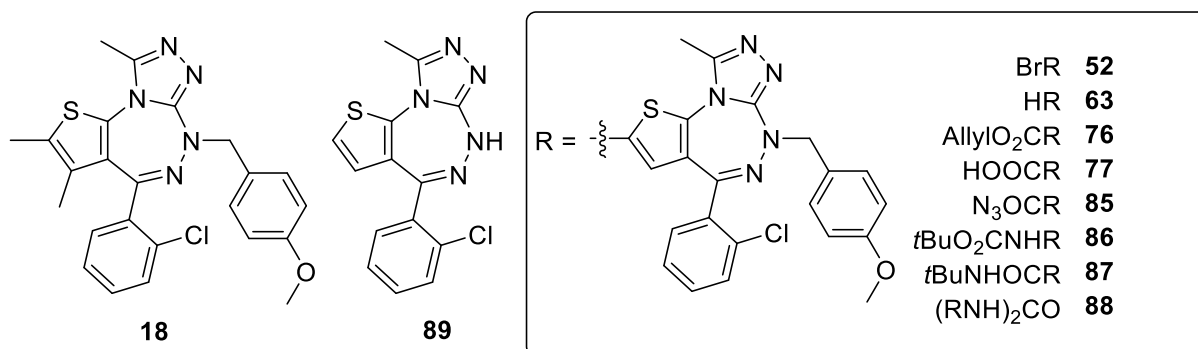


Abbildung 3.11: Leitstruktur **18** aus der Serie der *o*-Cl-JQ1-Analoga und im *Thermal Shift Assay* (Tabelle 3.7) getestete Substanzen der C-2 substituierten Triazolothienotriazepine.

	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	PB1(5)	PCAF
18	2.1	5.7	3.3	6.7	3.7	7.3	0.6	7.7	-0.2	-0.8	-0.2	0.0
52	0.9	3.4	1.8	3.4	2.2	2.6	0.5	3.5	0.0	0.1	0.6	1.2
63	2.3	4.8	2.8	4.1	2.2	4.7	0.7	5.5	0.6	0.0	0.7	2.3
76	0.6	2.3	0.8	2.0	0.7	2.4	0.3	1.6	0.3	-0.1	-0.2	0.2
77	2.9	5.7	4.2	4.7	4.6	5.4	1.6	4.9	-0.3	-0.3	-0.2	0.4
85	1.4	2.7	1.6	2.8	1.8	1.8	1.1	2.5	0.5	0.1	0.5	1.2
86	1.1	2.4	1.0	2.2	1.4	2.6	-0.1	1.7	0.1	-0.1	0.4	0.8
87	3.5	5.6	4.5	5.0	4.7	6.2	0.7	5.7	0.2	0.8	-0.2	0.8
88	0.3	0.5	0.3	0.1	0.4	-0.2	0.1	0.7	0.0	-0.3	0.6	0.8
89	0.8	3.3	1.3	3.6	1.0	3.1	0.3	3.5	0.2	-0.5	0.5	0.6

ΔT_m (°C)	
	<0
	0-2
	2-4
	4-6
	6-8
	>8

Tabelle 3.7: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* für die an C-2 substituierten Triazolothienotriazepin-Derivate. Zum Vergleich wird die Leitstruktur **18** aus der *o*-Cl-JQ1-Analogaserie gezeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Synthese von an C-2 substituierten Triazolothienotriazepinen als Hybride aus den Triazolobenzotriazepinen und den Thiophenanalogen JQ1-Analoga mit beträchtlichem Aufwand doch noch gelungen ist.

Die Triazolobenzotriazepine, welche als neues Strukturelement erstmalig an C-8 polare Reste (z.B. Harnstoffe) tragen, wiesen eine deutliche Erhöhung der Affinität für die Bromodomänen auf. Die Thiophen-analoge Verbindung **18** aus der Serie der *o*-Cl-JQ1-Analoga zeigte eine sehr ausgeprägte Selektivität für die jeweils zweiten Bromodomänen, verbunden mit einer immer noch ansehnlich hohen Affinität. Eine logische Kombination war die Einführung polarer Reste an C-2 der neuen Triazolothienotriazepin-Grundstruktur.

Allerdings führte diese Kombination von Strukturelementen nicht zu dem erwünschten Ziel, sowohl die Affinität als auch Selektivität der Inhibitoren weiter zu steigern. Im Gegenteil, es wurde sowohl die Affinität als auch die Selektivität für die Bromodomänen überraschenderweise stark vermindert.

4. Biologische Testung

4.1 Hintergründe zu den zur Strukturoptimierung verwendeten biologischen Testungen

Zur Bestimmung und anschließenden Optimierung der *in vitro*-Affinitäten zu den Bromodomänen wurden zwei verschiedene Testsysteme verwendet: der *Thermal Shift Assay*, welcher bei allen Zielverbindungen zur Charakterisierung angewendet wurde, sowie die Messung von IC_{50} -Werten mittels AlphaScreen. Der AlphaScreen wurde aus Kapazitätsgründen überwiegend für die Reihe der Triazolothienotriazepine und nur für die BRD4(1) und BRD4(2) angewendet. Zudem wurden zur konkreteren Charakterisierung der molekularen Interaktionen Co-Kristallisationsexperimente von ausgewählten Liganden mit den Zielproteinen durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden an der Universität Oxford am Structural Genomics Consortium (SGC) vorwiegend von Dr. Sarah Picaud unter Leitung von Prof. Dr. Panagis Filippakopoulos durchgeführt.

4.2 *Thermal Shift Assay*

Mit dem *Thermal Shift Assay* konnten alle Zielverbindungen an bis zu dreizehn verschiedenen Bromodomänen getestet werden und so auf die relativen Affinitäten der Verbindungen an diesen Bromodomänen geschlossen werden. Der große Vorteil von *Thermal Shift Assays* zur Bestimmung der Bindungsinteraktionen ist, dass diese Technik sowohl schnell als auch günstig durchführbar ist. Dieser Assay kann an einem konventionellen real-time PCR-Gerät durchgeführt werden.^[155]

Der *Thermal Shift Assay* basiert auf der Thermostabilität der Proteinfaltung, welche mit der Gibbs-Energie der Entfaltung (ΔG_u) zusammenhängt und temperaturabhängig ist.^[156] Durch Erwärmen eines Proteins wird dieses denaturiert, dabei sinkt ΔG_u . An dem Punkt, an dem genauso viel gefaltetes wie durch Denaturierung entfaltetes Protein in Lösung vorliegt, wird vom Schmelzpunkt (T_m) dieses Proteins gesprochen und ΔG_u ist gleich null. Durch Bindung eines Liganden wird die Faltung des Proteins stabilisiert und ΔG_u steigt um den Wert der freien Energie der Liganden-Bindung (ΔG_b). Der Schmelzpunkt verschiebt sich zu höheren Temperaturen. Wenn dieser Vorgang reversibel ist und der Schmelzvorgang des Proteins nur zwei Zustände hat (natives und denaturiertes Protein, ohne Bildung von Intermediaten), gilt hierbei das Gleichgewicht des thermodynamischen Modells.^[157] Diese Schmelzpunktdifferenz

zwischen einem nativen Protein und dem Protein mit Liganden kann mit Hilfe des *Thermal Shift Assays* bestimmt werden.

Um den genauen Schmelzpunkt eines Proteins zu bestimmen, wird ein Farbstoff wie z. B. SYPRO® Orange verwendet, welcher sich unspezifisch an hydrophobe Oberflächen anlagern kann. In wässriger Umgebung wird die Fluoreszenz des Farbstoffs stark gelöscht. In Kontakt mit den hydrophoben Bindungsstellen eines Proteins, die nach der Denaturierung exponiert sind, fluoresziert dieser Farbstoff jedoch stark. SYPRO® Orange eignet sich besonders gut, da bei diesem auf Grund der hohen Anregungswellenlänge bei $\lambda = 492 \text{ nm}$ (gemessen in Puffer (10 mM 3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure pH 9.0, 150 mM NaCl) mit Hühnerei-Lysozym) keine optischen Störungen, wie das Quenchen der Fluoreszenz, durch kleine Moleküle zu erwarten sind.^[155, 158] Die Emission von SYPRO® Orange liegt bei $\lambda = 610 \text{ nm}$ (gemessen in Puffer).^[155]

Wird ein Protein in Lösung durch Erwärmen denaturiert, so werden hydrophobe Oberflächen exponiert, an denen sich der Farbstoff anlagert, was zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz führt. Bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes liegt demnach eine geringe Fluoreszenz vor. Bei Erhöhung der Temperatur wird die Fluoreszenz mit Zunahme der Denaturierung des Proteins verstärkt, bis ein Maximum erreicht wird. Die darauffolgende Abnahme der Fluoreszenz beruht auf der Proteinaggregation, durch welche die verfügbare hydrophobe Oberfläche, an welche der Farbstoff binden kann, verringert wird. Wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen, ergibt sich eine sigmoidale Kurve (Abb. 4.1). Die Schmelztemperatur, bei welcher gleich viel natives wie denaturiertes Protein in Lösung ist, befindet sich am Wendepunkt dieser sigmoidalen Kurve.^[155]

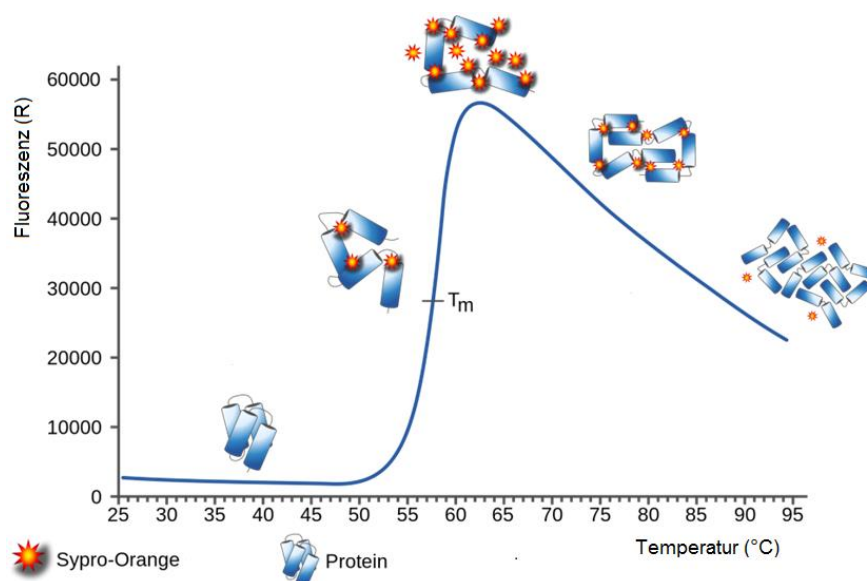


Abbildung 4.1: Typische Aufnahme der Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur in Gegenwart von SYPRO® Orange bei einem sich entfaltenden Protein.^[159]

Es wurde gezeigt, dass der stabilisierende Effekt von Liganden an Proteinen proportional zu der Konzentration und der Affinität des Liganden ist.^[160] Die Schmelzpunktdifferenzen (ΔT_m) werden aus der Differenz der Schmelzpunkte des Proteins mit bzw. ohne Ligand berechnet. Mit dieser Methode sind bei verschiedenen Proteinen oder Liganden unterschiedlicher Stoffklassen keine absoluten Vergleiche möglich. Die ΔT_m -Werte sind thermodynamische Werte und nicht nur von der Affinität und der Konzentration des Liganden abhängig, sondern auch von entropischen Effekten. Sehr gute und vergleichbare Ergebnisse erzielt diese Methode jedoch bei Inhibitoren aus derselben Stoffklasse, die an einem bestimmten Enzym getestet werden.^[161]

Die Ergebnisse der *Thermal Shift Assays* der einzelnen Zielverbindungen wurden schon in den jeweiligen Kapiteln (siehe Kapitel 3.1.1, 3.2.6, 3.3.4 und 3.4.7) präsentiert und diskutiert.

4.3 AlphaScreen

Beim AlphaScreen (Amplified Luminicent Proximity Homogeneous Assay Screen) handelt es sich um einen Bead-basierten Protein-Protein-Interaktions-Assay, mit dessen Hilfe molekulare Wechselwirkungen und somit auch IC_{50} -Werte bestimmt werden können. Der AlphaScreen ist ein leicht durchzuführender Assay auf einer Mikrotiterplatte, der ohne Waschvorgänge auskommt und so auch für Hochdurchsatzscreenings verwendet werden kann.

In diesem Assay generiert ein Donor-Bead durch Anregung mit einem Laser Singulett-Sauerstoffmoleküle. Dieser Singulett-Sauerstoff ist sehr kurzlebig und kann daher nur über eine Distanz von ca. 200 nm diffundieren. Trifft der Singulett-Sauerstoff auf ein entsprechend präpariertes Akzeptor-Bead, so wird in dem Akzeptor-Bead eine chemische Kaskade ausgelöst, die zur Aussendung eines Chemilumineszenz-Signals führt. In dem Donor-Bead ist als Farbstoff Phthalocyanin enthalten, welches durch Licht der Wellenlänge 680 nm angeregt wird, woraufhin Singulett-Sauerstoff generiert wird. Im Akzeptor-Bead sind drei Farbstoffe enthalten: Thioxen, Anthracen und Rubren. Thioxen reagiert mit dem Singulett-Sauerstoff und sendet Energie aus, welche auf Anthracen und dann auf Rubren transferiert wird. Rubren emittiert daraufhin Licht der Wellenlänge von 520 - 620 nm. Da beide Beads in dem Assay nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden, wird nur selten eine zufällige Annäherung dieser unter 200 nm erreicht, so dass es kaum zur Hintergrundstrahlung kommt. Nur wenn diese beiden Beads über zwei Bindungspartner, welche auf den jeweiligen Beads immobilisiert sind, miteinander verbunden sind, besteht eine geringere Entfernung der beiden Beads als 200 nm. Bei Anregung mit einem Laser bei 680 nm wird der Singulett-Sauerstoff am Donor-Bead generiert und gelangt bis zum Akzeptor-Bead, welcher daraufhin Chemilumineszenz aussendet.^[162]

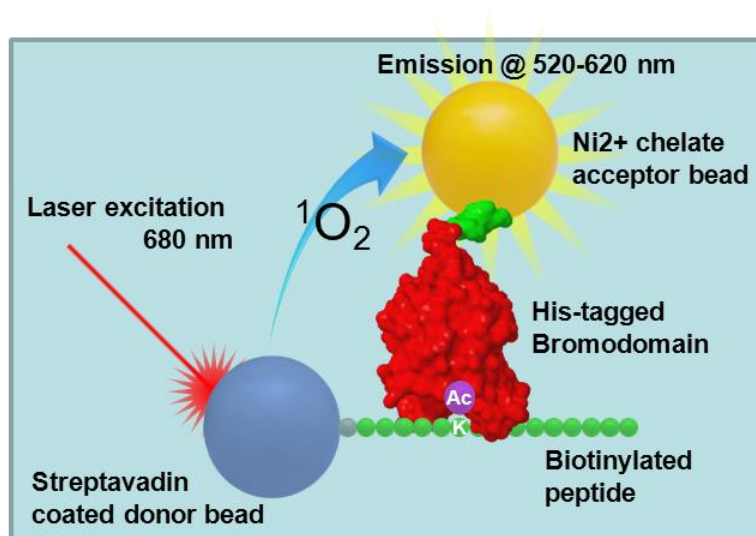


Abbildung 4.2: Prinzip des AlphaScreens zur IC_{50} -Wert Bestimmung.^[163]

Um die IC_{50} -Werte der BRD4(1) und BRD4(2) messen zu können, werden auf einem Streptavidin-beschichteten Donor-Bead Peptide immobilisiert, welche biotinyliert sind (Abb. 4.2). Diese Peptide enthalten ϵ -N-acetylierte Lysine (KAc), welche von Bromodomänen erkannt werden. Ein zweiter Bead, welcher mit Ni^{2+} -Ionen beschichtet ist, ist der Akzeptor-Bead. Auf diesem Bead werden His-Tag-markierte Proteine, in diesem Fall Bromodomänen (BRD4(1) oder BRD4(2)), immobilisiert. Wenn die Bromodomäne an das acetylierte Lysin bindet, wird durch Annäherung des Donor- und des Akzeptor-Beads letztendlich Licht ausgesendet, denn der emittierte Singulett-Sauerstoff des Donor-Beads kann durch die räumliche Nähe mit den Farbstoffen des Akzeptor-Beads reagieren. Wird ein Protein-Protein-Interaktions-Inhibitor zu dieser Lösung gegeben, so wird die Protein-Protein-Interaktion in Abhängigkeit der Konzentration des Inhibitors und dessen Potenz verhindert und das Signal entsprechend verringert.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden die AlphaScreens, wie vom Hersteller (PerkinElmer, USA) beschrieben, verwendet. Messung und Berechnungen der AlphaScreens erfolgten an der Universität Oxford.

4.3.1 Ergebnisse und Diskussion der Messungen mittels AlphaScreen

In Tabelle 4.1 werden alle gemessenen IC₅₀-Werte aus dem AlphaScreen gezeigt.

Verbindung	IC ₅₀ (nM)	
	BRD4(1)	BRD4(2)
17	28.8 ± 2.3	4.3 ± 0.2
18	264.9 ± 19.3	3.6 ± 0.7
21d	1.9 ± 0.0	0.5 ± 0.2
41	6896.4 ± 543.1	95.0 ± 10.7
42	5.1 ± 0.1	1.2 ± 0.0
43a	2042.1 ± 227.7	34.3 ± 3.5
43b	151.7 ± 7.9	2.7 ± 0.1
43d	34.7 ± 3.9	3.9 ± 0.4
43e	3.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
43f	431.3 ± 27.0	4.3 ± 0.4
44c	418.9 ± 42.0	10.6 ± 0.9
44e	12.0 ± 0.2	1.4 ± 0.0
44f	58.2 ± 7.0	11.1 ± 1.5
JQ1	0.6 ± 0.4	1.0 ± 0.1

Tabelle 4.1: IC₅₀-Werte ermittelt durch einen AlphaScreen Assay; Referenzsubstanz: **JQ1**.

Die Werte zeigen, dass alle vermessenen JQ1-Analoga hervorragende Protein-Protein-Interaktions-Inhibitoren sind. Alle Inhibitoren zeigen für die BRD4(2) IC₅₀-Werte im ein- oder zweistelligen nanomolaren Bereich. Besonders hervorzuheben sind die Ergebnisse von **18** und **43f**. Die Strukturformeln werden in Abb. 4.3 gezeigt. **18** ist ein *o*-Cl-JQ1-Analogon mit einem *para*-Methoxybenzylrest an N-6. Diese Verbindung zeigen einen um Faktor 75 kleineren IC₅₀-Wert für BRD4(2) verglichen mit BRD4(1) und ist somit für die BRD4(2) außergewöhnlich selektiv. Das *p*-Cl-JQ1-Anlogon **43f** übertrifft mit einem Trimethoxybenzylrest an N-6 mit einen um Faktor 100 kleineren IC₅₀-Wert für BRD4(2) verglichen mit BRD4(1) sogar die Selektivität von **18**. Mit Hilfe des *Thermal Shift Assays* erfolgte eine lückenlose Betrachtung aller Bromodomänen im Gegensatz zum durchgeführten AlphaScreen, welcher nur BRD4 und nicht BRD2, BRD3 und BRDT betrachtet. Im *Thermal Shift Assay* wurden für **18** bessere Werte in Bezug auf die Selektivität für die jeweils zweiten Bromodomänen gemessen als **43f**. Daher wurde **18** als Leitstruktur für weitergehende Untersuchungen ausgewählt.

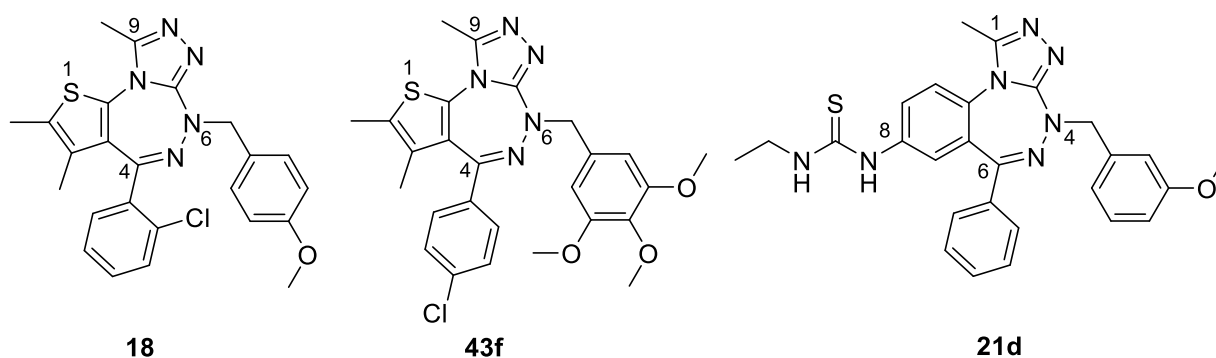


Abbildung 4.3: Strukturformeln der JQ1-Analoga **18**, **43f** und des Triazolobenzotriazepins **21d**.

Zudem wurde als einziges Triazolobenzotriazepin der Thioharnstoff **21d** (Abb. 4.3) vermessen. Dieser zeigt im Vergleich zu allen anderen gemessenen Verbindungen die beste Inhibition, da die IC_{50} -Werte im einstelligen nanomolaren Bereich liegen. Diese sind vergleichbar mit denen des bekannten Inhibitors **JQ1**, die unten in der Tabelle 4.1 als Vergleichswerte angegeben sind. Allerdings weist die Verbindung **21d** ähnlich wie **JQ1** keine Selektivität für die BRD4(2) auf.

4.4 Co-Kristallisation

Für die Bestimmung der Affinitäten sind *Thermal Shift Assays* sehr aussagekräftig, jedoch lassen sich weder die Bindungstasche noch der Bindungsmodus mit dieser Technik identifizieren. Dies kann mit Hilfe von Kristallisationsstudien erreicht werden. Co-Kristallstrukturen geben gute Informationen über die räumliche Koordination des jeweiligen Liganden in einem Protein und können so zur Strukturoptimierung beitragen.

Es lässt sich anhand einer Co-Kristallstruktur erkennen, wie ein Ligand in der Bindungstasche gebunden ist und welche Aminosäuren involviert sind. Zudem kann ermittelt werden, ob Wasserstoffbrückenbindungen vorliegen und ob diese direkt vom Ligand zum Protein oder über Wassermoleküle verlaufen. Mit Hilfe der Software (WinCoot) kann ebenfalls die Distanz und der Winkel des Liganden zu bestimmten funktionellen Gruppen des Proteins berechnet werden und Strukturen anschließend optimiert werden.

Darstellung, Messung und Berechnungen der Co-Kristallstrukturen erfolgten am SGC der Universität Oxford. Die Ergebnisse und Diskussionen für die Co-Kristalle von **21e** an BRD4(1) (siehe Kapitel 3.1.1) sowie **32** an BRD4(1) (siehe Kapitel 3.2.6) und **33c** an BRD2(2) (siehe Kapitel 3.2.6) erfolgten in den jeweiligen Kapiteln.

4.5 Weitere biologische Testungen

Neben den schon beschriebenen Testungen wurden in der Abteilung Biologische Prüfung unseres Arbeitskreises von Frau Martina Stadler zu jeder Zielverbindung sowie allen im experimentellen Teil beschriebenen Zwischenstufen zwei Tests durchgeführt. Zur Bestimmung der jeweiligen Toxizität der Verbindung wurde ein MTT-Test und zur Ermittlung der Wachstumshemmung bei Mikroorganismen ein Agar-Diffusionstest durchgeführt.

4.5.1 Agar-Diffusionstest

Alle synthetisierten Zielverbindungen und aufgereinigten Zwischenstufen wurden mit Hilfe des Agar-Diffusionstest auf ihre antimikrobiellen Aktivitäten untersucht. Dazu wird eine bestimmte Menge (jeweils 30 µg) der Zielverbindung auf ein Plättchen aufgetragen. Diese Plättchen werden auf Agar-Nährböden, die mit verschiedenen Modellkeimen (Tabelle 4.2) versetzt sind, aufgelegt und anschließend werden die Agarplatten bebrütet. Die zuvor klaren Agarplatten werden durch das Wachsen der jeweiligen Modellkeime trüb. Wirkt die jeweilige Verbindung wachstumshemmend auf den Modellkeim, so werden Hemmhöfe um das jeweilige Plättchen herum gebildet. Zu erkennen sind die Hemmhöfe daran, dass die Agarplatte um das Plättchen mit der Verbindung herum klar bleibt, also kein Wachstum des Modellkeims stattfindet. Der Durchmesser dieser Hemmhöfe wird vermessen. Die so erhaltenen Daten ergeben jedoch keine quantifizierbare Aussage über die Stärke des antimikrobiellen Effekts, da die Hemmhofdurchmesser auch abhängig von der Diffusion der Verbindung im Nährboden sind. Für den antibakteriellen Effekt wurde Tetracyclin (**90**) und für den antifungalen Effekt wurde Clotrimazol (**91**) als Referenzsubstanz aufgetragen (Abb. 4.4).

Mikroorganismus	DSM-Nummer	Art
<i>Escherichia coli</i>	426	gramnegatives Bakterium
<i>Pseudomonas marginalis</i>	7527	gramnegatives Bakterium
<i>Staphylococcus equorum</i>	20675	grampositives Bakterium
<i>Streptococcus entericus</i>	14446	grampositives Bakterium
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1345	Hefe
<i>Candida glabrata</i>	11226	Hefe
<i>Aspergillus niger</i>	1988	Schimmelpilz
<i>Hyphopichia burtonii</i>	70663	Dermatophyt

Tabelle 4.2: Im Agar-Diffusionstest verwendete Mikroorganismen.

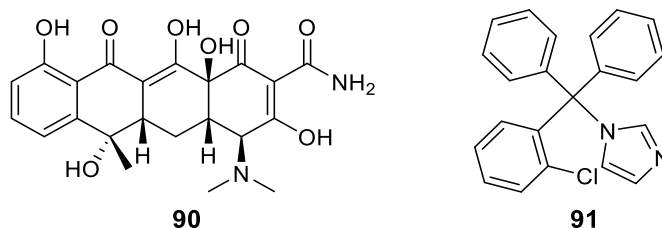


Abbildung 4.4: Im Agar-Diffusionstest verwendete Referenzsubstanzen Tetracyclin (**90**) und Clotrimazol (**91**).

4.5.1.2 Ergebnisse und Diskussion des Agar-Diffusionstests

Mit dem Agar-Diffusionstest wurden alle synthetisierten Bromodomänen-Inhibitoren aus den Stoffklassen der Triazolobenzotriazepine und Triazolothienotriazepine und auch die meisten Zwischenstufen auf ihre antimikrobielle Aktivität getestet. Die einzigen, nicht getesteten Zwischenprodukte sind die Isothiocyanate **12** und **13**, da diese nur als Rohprodukte vorlagen und nicht weiter aufgereinigt wurden. Die Angabe der Durchmesser der Hemmhöfe erfolgt in Millimeter (mm), als totaler Hemmhof (TH) oder als Wachstumshemmung (WH). Sofern keine antimikrobielle Aktivität gegen einen bestimmten Modellkeim ermittelt werden konnte, ist dies durch einen Strich (----) gekennzeichnet. Die zwei Verbindungen, die antimikrobielle Aktivitäten zeigten, sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Substanz	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas marginalis</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>	<i>Streptococcus entericus</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Hyphopichia burtonii</i>
Tetracyclin	30 TH	32 TH	33 TH	31 TH	----	----	----	----
Clotrimazol	----	----	----	----	19 TH	22 TH	20 TH	18 TH
53	----	----	----	----	----	----	10 WH	----
59	----	----	10 TH	14 WH	10 WH	10 WH	8 TH	10 WH

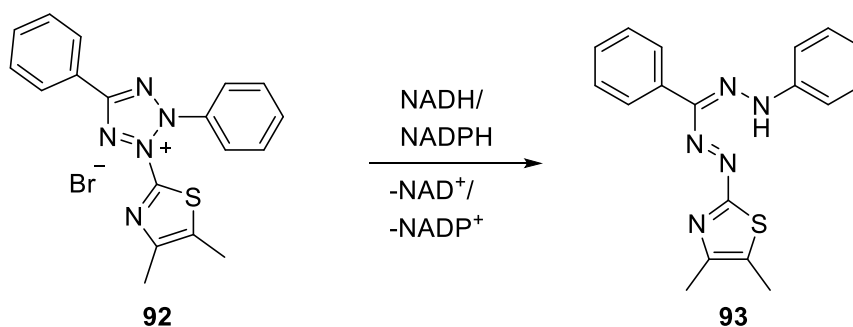
Tabelle 4.3: Ergebnisse des Agar-Diffusionstests.

Weder Triazolobenzotriazepine noch Triazolothienotriazepine bildeten Hemmhöfe auf den Agarplatten. Dementsprechend zeigten all diese Zielverbindungen keine antimikrobiellen Eigenschaften. Auch die meisten Zwischenstufen zeigen keine Hemmhöfe, abgesehen von dem aufgereinigten Isothiocyanat **59** und der Acetylverbindung **53** (Tabelle 4.3). Das (2-Chlorphenyl)(2-isothiocyanatothiophen3-yl)methanon (**59**) weist gegen alle Mikroorganismen außer den gramnegativen Bakterien einen mäßigen antimikrobiellen Effekt auf. Das *N*-(3-(2-Chlorbenzoyl)thiophen-2-yl)acetamid (**53**) weist eine geringe antifungale Aktivität gegen den Schimmelpilz *aspergillus niger* auf.

Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass die in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen keine erwähnenswerte antimikrobielle Aktivität aufweisen. Die Verbindungen besitzen somit kein Potenzial für eine Anwendung als Antiinfektiva. Allerdings wären von diesen bei Applikation am Menschen - soweit untersucht - auch keine unerwünschten antimikrobiellen Effekte zu befürchten.

4.5.2 MTT-Test

Alle synthetisierten Zielverbindungen werden mittels eines MTT-Tests nach der Standardmethode von T. Mosmann^[164] auf ihre Zytotoxizität getestet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Reduktion eines Farbstoffs, welche nur in metabolisch aktiven, lebenden Zellen abläuft. Der wasserlösliche, gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (**92**) wird unter Verbrauch von NADH oder NADPH zur wasserunlöslichen, dunkelblauen Formazanverbindung **93** reduziert (Schema 4.1). Dies geschieht mit Hilfe zytosolischer Oxidoreduktasen. Die Menge des produzierten Formazans **93**, welche photometrisch bestimmt werden kann, korreliert direkt mit der Zellviabilität. Für diesen Assay werden humane Leukämiezellen der Linie 60 (HL-60) verwendet. Als Positivkontrolle wird das nicht-ionische Detergenz Triton-X 100 eingesetzt. Anhand des Assays lassen sich nur Aussagen über die Zytotoxizität der jeweiligen Verbindungen treffen, jedoch nicht zum Wirkmechanismus, der zu dieser zytotoxischen Aktivität führt.



Schema 4.1: Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes **92** in ein blaues Formazan-Produkt **93**.

4.5.2.1 Ergebnisse und Diskussion der MTT-Tests

In Tabelle 4.4 werden alle gemessenen IC_{50} -Werte der Triazolobenzotriazepine und Triazolothienotriazepine gezeigt.

Verbindung	IC_{50} (μM)	Verbindung	IC_{50} (μM)	Verbindung	IC_{50} (μM)
2	> 50	42	> 50	11	33
17	17	43a	13	15	> 50
18	16	43b	18	16	> 50
21a	> 50	43c	38	26	36
21b	35	43d	16	27	8
21c	27	43e	16	29	> 50
21d	37	43f	17	39	> 50
21e	11	44a	17	40	> 50
30	> 50	44b	18	46	> 50
31a	> 50	44c	17	47	23
31b	26	44d	> 50	48	28
31c	> 50	44e	32	49	> 50
32	> 50	44f	> 50	51	> 50
33a	> 50	52	26	53	> 50
33b	24	63	26	54	> 50
33c	31	76	17	55	> 50
33d	16	77	> 50	59	> 50
33e	10	85	14	60	> 50
33f	20	86	> 50	61	> 50
33g	30	87	> 50	62	> 50
34	29	88	> 50	73	36
41	42	89	> 50	75	> 50

Tabelle 4.4: Durch den MTT-Test ermittelte IC_{50} -Werte aller Triazolobenzotriazepine und Triazolothienotriazepine (Tabelle links). Die rechte Tabelle zeigt alle im experimentellen Teil beschriebenen Zwischenprodukte (außer **12** und **13**, bei diesen beiden wurden die Rohprodukte direkt weiterverarbeitet).

Um die Messergebnisse interpretieren zu können, sollte darauf hingewiesen werden, dass eine signifikante Zytotoxizität bei IC_{50} -Werten von $\leq 5 \mu M$ vorliegt, was dem Wert von Cisplatin

entspricht. Demzufolge weist keine der Verbindungen aus der Klasse der Triazolobenzotriazepine und Triazolothienotriazepine eine signifikante Zytotoxizität auf. Interessanterweise lassen sich bei den beiden *tert*-Butylharnstoff-substituierten Triazolobenzotriazepinen die niedrigsten IC₅₀-Werte feststellen. Diese beiden an C-8 (Verbindung **21e**) bzw. an C-9 (Verbindung **33e**) mit Harnstoffen substituierten Triazolobenzotriazepine haben IC₅₀-Werte von 11 µM bzw. 10 µM. Alle übrigen Verbindungen, ob mit Thiophen- oder Benzolstruktur, kommen auf IC₅₀-Werte außerhalb des relevanten Bereichs.

Als einzige Zwischenstufe kommt das Isothiocyanat **27** mit einem IC₅₀-Wert von 8 µM auf den kleinsten Wert und weist daher die größte Zytotoxizität der getesteten Verbindungen auf. Die hohe Toxizität dieses Isothiocyanats **27** ist nicht überraschend, da Isothiocyanate unspezifisch Bionukleophile addieren können.

5. Zusammenfassung

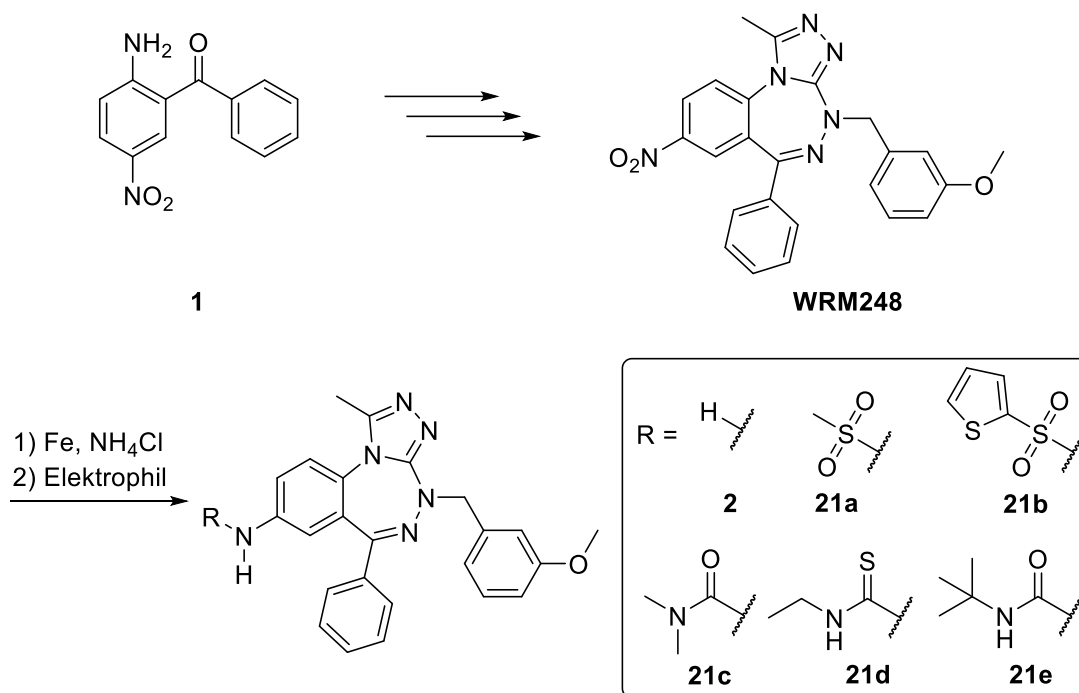
Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer, selektiver Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren für die Bromodomänen der BET-Familie. Diese Proteindomänen sind wichtige Erkennungsdomänen von epigenetischen Modifikationen, den ϵ -N-acetylierten Lysinen auf Histonen.^[65] BET-Proteine weisen viele wichtige regulatorische Eigenschaften auf, so dass es bei Dysfunktion der Proteine zu diversen Krankheiten^[65, 92] wie aggressiven Epithelzellkarzinomen^[78-80] kommen kann. Selektive Inhibitoren für Bromodomänen können neue Therapiemöglichkeiten eröffnen.

Neben der Synthese potentieller Wirkstoffkandidaten war ein Ziel die Entwicklung von selektiven Inhibitoren als molekulare Werkzeuge zur Untersuchung der Funktionen der einzelnen Bromodomänen-Untereinheiten. In einer vorangegangenen Dissertation von M. Wrobel in unserer Arbeitsgruppe war bei Triazolobenzotriazepinen schon eine Tendenz für die Inhibition der jeweils zweiten Bromodomänen der BET-Familie zu erkennen. Da es sich bei Bromodomänen der BET-Familie um stark konservierte Untereinheiten handelt, ist es sehr schwierig, selektive Inhibitoren für nur eine Untereinheit zu entwickeln.

Diese Arbeit führte zu 54 Inhibitoren, welche von mir an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München synthetisiert wurden. Die anschließenden Messungen der Affinitäten der Inhibitoren an den jeweiligen Bromodomänen erfolgten mit verschiedenen Techniken (*Thermal Shift Assay*, AlphaScreen) am SGC der Universität Oxford. Von drei Verbindungen (**21d**, **21e** und **32**) wurden in Oxford zusätzlich Co-Kristallstrukturen erhalten.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren Triazolobenzotriazepine, die M. Wrobel^[93] in seiner Dissertation als BET-Bromodomänen-Inhibitoren entwickelt hatte. Um in dieser Stoffklasse weitere Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ableiten zu können, wurden im ersten und zweiten Abschnitt dieser Arbeit Triazolobenzotriazepine, welche den von M. Wrobel optimierten *meta*-Methoxybenzylrest an Position 4 tragen, nun mit neuen Substituenten in den Positionen 8 und 9 untersucht. Im dritten Abschnitt wurden zwei Serien von JQ1-Analoga hergestellt, welche formal Hybridstrukturen aus Triazolobenzotriazepinen und dem Triazolothienodiazepin **JQ1** darstellen. Im vierten Abschnitt wurden alle erzielten Erkenntnisse aus den Inhibitoren der ersten drei Abschnitte kombiniert in einem neuen Chemotyp, in der Hoffnung, so noch selektivere und/oder affinere Inhibitoren zu erhalten.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde von dem 8-Nitrotriazolobenzotriazepin **WRM248** von M. Wrobel ausgegangen, welches aus 2-Amino-5-nitrobenzophenon (**1**) in einer fünfstufigen Synthese aufgebaut werden konnte. Aus **WRM248** konnten durch Reduktion der Nitrogruppe und weiteren Folgereaktionen neue stickstoffhaltige Substituenten wie Amine und daraus abgeleitete Derivate an C-8 generiert werden (Schema 5.1).



Schema 5.1: Synthese des 8-Aminotriazolobenzotriazepins **2** und von weiteren funktionalisierten Derivaten **21a-e**.

Der *Thermal Shift Assay* (Tabelle 5.1) zeigte, dass stark polare Reste mit Wasserstoffbrückendonator-Eigenschaften, wie der Harnstoff **21e**, im Vergleich zur Nitroverbindung **WRM248** einen äußerst positiven Effekt auf die Affinität der Inhibitoren für die Bromodomänen der BET-Familie haben. So zeigten diese Triazolobenzotriazepin-Inhibitoren, allen voran der Harnstoff **21e**, im Vergleich zu anderen Triazolobenzotriazepinen noch nie zuvor erreichte Schmelztemperaturdifferenzen. Die Sulfonamide besitzen im Vergleich zu den Harnstoffen weniger NH-Funktionen und somit Wasserstoffbrückendonatoren und dafür viele Wasserstoffbrückenakzeptoren in Form von Sauerstoffatomen. Dies scheint die Affinität der Inhibitoren nicht zu steigern.

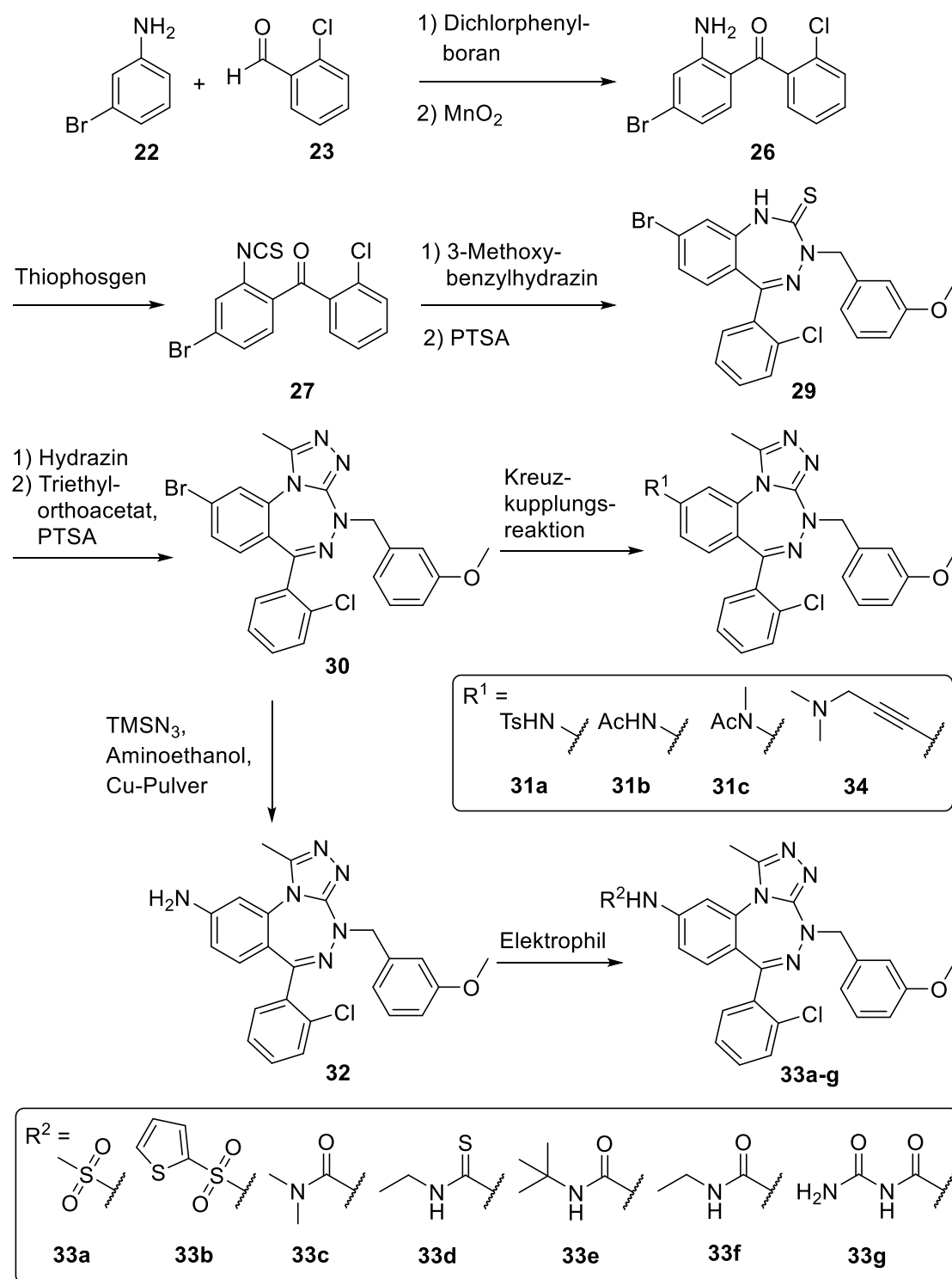
														ΔT_m (°C)	
															<0
															0-2
															2-4
															4-6
															6-8
															>8
	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	LOC93349	PB1(5)	PCAF		
WRM248	2.3	6.0	3.7	5.8	5.2	7.0	1.5	5.6	0.2	-0.2	0.4	0.4	0.4		
21e	6.7	3.8	8.1	9.5	10.6	10.4	5.5	11.5	0.6	2.2		0.7	0.6		

Tabelle 5.1: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* der Zwischenstufe **WRM248** und des *tert*-Butylharnstoffderivats **21e**.

Zudem konnte das *tert*-Butylharnstoffderivat **21e** mit BRD4(1) co-kristallisiert werden. Anhand der Kristallstruktur konnten konkrete Aussagen zum Bindungsmodus getroffen werden. Ähnlich wie das bekannte, verwandte Triazolobenzodiazepin **I-BET762**, liegt **21e** so in der Bindungstasche, dass der Triazolring in die *N*-Acetyllysin-Bindungstasche ragt und in dieser über zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den beiden konservierten Aminosäuren Asparagin und Tyrosin interagiert. Der *tert*-Butylharnstoffrest bindet mit seinen beiden NH-Gruppen über zwei Wassermoleküle an den ZA-Tunnel. Diese neue Interaktion ist offensichtlich ausschlaggebend für die Affinitätssteigerung. Der *tert*-Butylrest ragt dabei aus der Bindungstasche heraus.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde einerseits die Rolle der neu entwickelten stickstoffhaltigen Substituenten am Benzenring des Triazolobenzotriazepin-Grundkörpers weiter untersucht, indem diese Gruppen von C-8 nach C-9 verschoben wurden. Ferner wurde, basierend auf zwischenzeitlichen Erkenntnissen von M. Wrobel, die Rolle von Chlorsubstituenten am Phenylrest an C-6 näher beleuchtet.

Die Synthese des 9-Bromtriazolobenzotriazepins **30** mit einem *ortho*-Chlorsubstituenten an der 6-Phenylgruppe gelang nach der erprobten Synthesestrategie (Schema 5.2). Hierzu wurde das 2-Amino-3-brombenzophenon (**26**) aus 3-Bromanilin (**22**) und 2-Chlorbenzaldehyd (**23**) unter Zusatz von Dichlorphenylboran und einer anschließenden Oxidation mittels Braunstein hergestellt. Anschließend wurde das Aminobenzophenon **26** mit Thiophosgen zum Isothiocyanat **27** umgesetzt. Durch Einbau des 3-Methoxybenzylhydrazins (**5**) und nachfolgende Behandlung mit *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat wurde das Benzotriazepin **29** erhalten. Darauf folgende Kondensation mit Hydrazin und Anellierung mit Triethylorthoacetat lieferte das 9-Bromtriazolobenzotriazepin **30**.



Schema 5.2: Synthese verschiedener Amide (**31a-c**) und eines Alkins (**34**) mit Hilfe von Palladium-katalysierten Kreuzkupplungen, sowie der funktionalisierten 9-Aminotriazolobenzotriazepine (**33a-g**) über das primäre Amin **32**.

Aus dieser Bromverbindung **30** als zentraler Zwischenstufe konnten dann über Kreuzkupplungsreaktionen (Buchwald-Hartwig-Reaktionen, Sonogashira-Reaktion) neue Analoga mit Substituenten wie Amid- oder Aminoalkinresten an C-9 erhalten werden. Die Bromverbindung **30** konnte zudem mit Trimethylsilylazid und Kupferpulver in ein primäres Amin **32** überführt und unter Zugabe verschiedener Elektrophile weiter zu einer Reihe von Harnstoffen, Thioharnstoffen und Sulfonamiden funktionalisiert werden.

Die Ergebnisse aus dem *Thermal Shift Assay* zeigten, dass größere Substituenten an C-9 der Triazolobenzotriazepine nicht toleriert werden. Die besten Affinitäten in dieser Serie wurden mit Verbindung **32** erzielt, welche einen kleinen, primären Aminosubstituenten an C-9 beinhaltet (Tabelle 5.2). Diese Verbindung **32** zeigt als einzige aus dieser Reihe gute Temperaturdifferenzen und eine ausgeprägten Selektivität für die zweiten Bromodomänen innerhalb der BET-Familie. Das Stellungsisomer, welches an C-8 einen primären Aminosubstituenten aufweist, ist Verbindung **2** und weist verglichen mit **32** sowohl eine etwas geringere Affinität als auch Selektivität auf. Im Vergleich von Verbindung **32** zu dem *tert*-Butylharnstoff **21e** aus der C-8-Reihe sind jedoch die Temperaturdifferenzen im *Thermal Shift Assay* und somit auch die Affinität deutlich geringer. Vorteilhaft ist bei **32** allerdings verglichen mit **21e** die deutlich ausgeprägtere Selektivität für die jeweils zweiten Bromodomänen in der BET-Reihe. Die ausgeprägtere Selektivität von **32** ist ein weiteres Indiz für die Steigerung der Selektivität durch den neu eingeführten *ortho*-Chlorphenylrest in Position-6.

	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	PB1(5)	PCAF
2	3.2	4.4	4.6	6.1	5.6	7.9	1.7	7.5	-2.3	-4.5	-3.1	-0.8
32	3.6	6.7	4.8	6.4	4.8	6.6	1.7	7.9	1.0	1.7	1.4	1.5

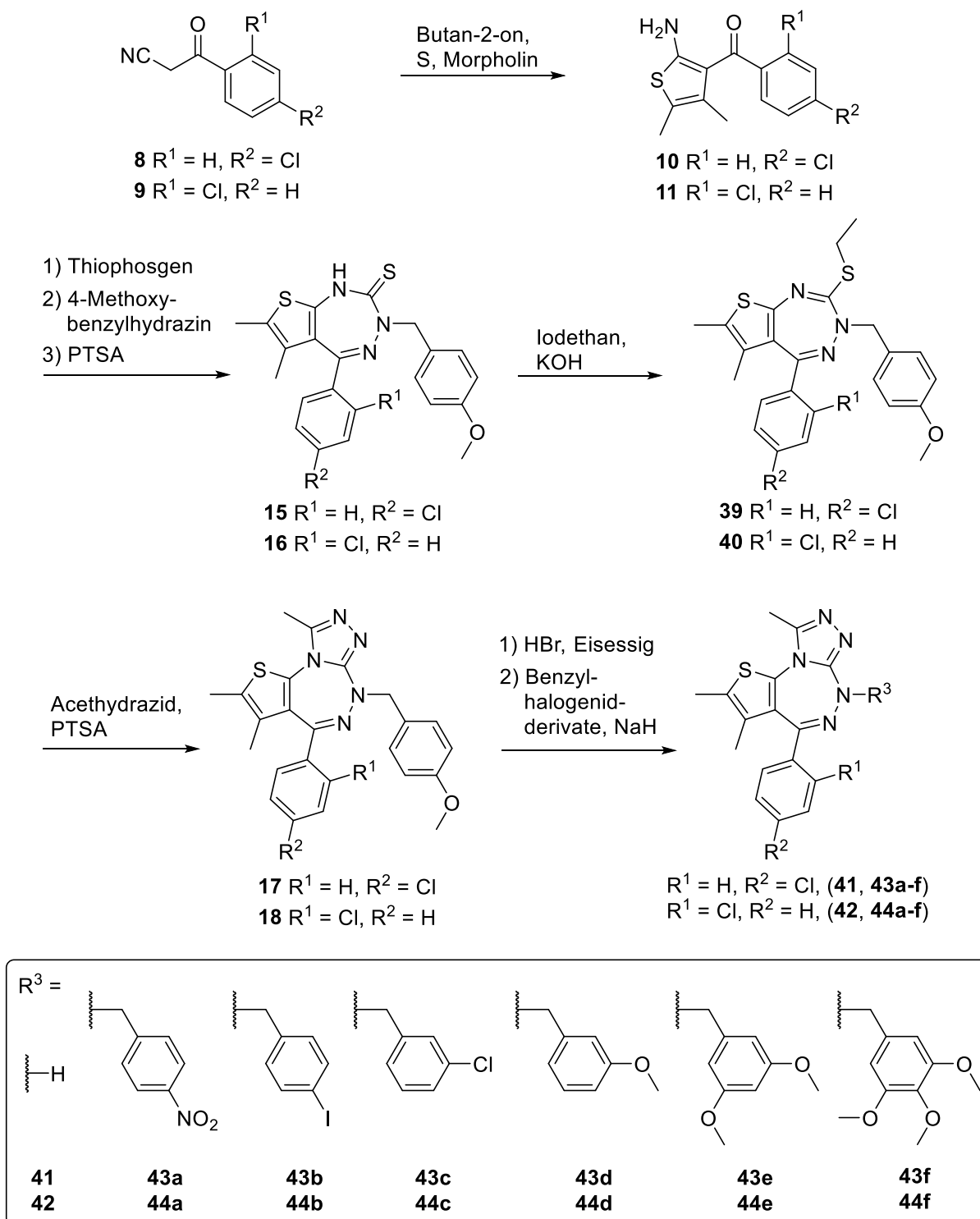
ΔT_m (°C)	
	<0
	0-2
	2-4
	4-6
	6-8

Tabelle 5.2: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* der an C-8 Aminosubstituierten Verbindung **2** und der an C-9 Aminosubstituierten Verbindung **32**.

Im dritten Abschnitt dieser Arbeit wurde ein Zugang zu den Triazolothienotriazepinen entwickelt, welche formal Hybridstrukturen aus Triazolobenzotriazepinen und dem Triazolothienodiazepin **JQ1**, einem der am intensivsten erforschten Inhibitoren von BET-Bromodomänen, darstellen. Um die Frage zu klären, ob die *ortho*- oder die *para*-Chlorsubstitution des 4-Phenylrings dieser JQ1-Analoga die Selektivität zur zweiten Bromodomäne erhöht, wurden zwei analoge Serien, die sogenannten *o*-Cl-JQ1-Analoga bzw. *p*-Cl-JQ1-Analoga, synthetisiert. Zugleich wurde in Position N-6 der Benzylrest mit höchster Affinität gesucht.

Die entwickelte Synthesestrategie ist in Schema 5.3 dargestellt. Die für diese Synthese benötigten (2-Aminothiophen-3-yl)(phenyl)methanone **10** und **11** konnten mit einer Gewald-Reaktion aus einfachen Bausteinen (chlorierte Benzoylacetonitrile, Butan-2-on und elementarer Schwefel) aufgebaut werden. In Analogie zu der oben beschriebenen Strategie zur Synthese von Triazolobenzotriazepinen wurden diese Intermediate **10** und **11** mit Thiophosgen zu den Isothiocyanaten **12** und **13** und anschließend weiter mit 4-Methoxybenzylhydrazin (**14**) zu den Thienotriazepinthionen **15** und **16** umgesetzt, um eine von N-6 mit HBr abspaltbare PMB-Schutzgruppe zu erhalten. Darauf folgende Versuche zur Anellierung des Triazolrings nach der etablierten Methode (Kondensation mit Hydrazin, Cyclisierung mit Triethylorthoacetat/*p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat) lieferten überraschenderweise nicht die gewünschten Produkte **17** und **18**. In Anlehnung an ein Verfahren von M. Di Braccio *et al.*^[121] konnte der Triazolring schließlich über die S-Ethylthioverbindungen **39** bzw. **40** und Cyclisierung mit Acethydrazid unter *p*-Toluolsulfonsäure-Katalyse anelliert werden.

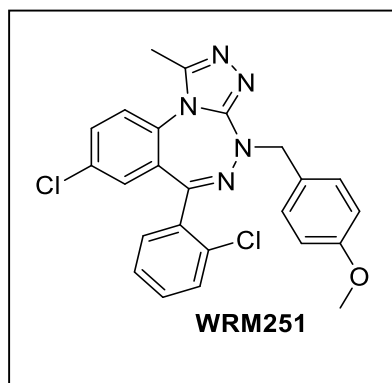
Die *para*-Methoxybenzyl-Gruppen an N-6 wurden mit Bromwasserstoff in Eisessig entfernt. Durch nachfolgende *N*-Alkylierung mit unterschiedlich substituierten Benzylhalogeniden wurden je sechs Modifikationen des Benzylrings (mit 4-Nitro-, 4-Iod-, 3-Chlor-, 3-Methoxy-, 3,5-Dimethoxy- und 3,4,5-Trimethoxy-Substitution) an Position N-6 durchgeführt.



Schema 5.3: Synthese der beiden Serien der *p*-Cl-JQ1-Analoga ($R^1 = \text{H}, R^2 = \text{Cl}$) und der *o*-Cl-JQ1-Analoga ($R^1 = \text{Cl}, R^2 = \text{H}$).

Die Testung dieser zwei Serien (*Thermal Shift Assay*) ließ mehrere Schlussfolgerungen zu (Tabelle 5.3).

- Die *para*-Chlorsubstitution am Phenylring in Position 4 führt zu hochaffinen Verbindungen für die Bromodomänen der BET-Familie.
- Verbindungen mit *ortho*-Chlorsubstitution am Phenylring sind zwar nicht ganz so affin, haben aber eine hervorragend ausgeprägte Selektivität für jeweils die zweiten Bromodomänen der BET-Familie (also für BRD2/3/4/T(2)).



- Im Vergleich der *o*-Cl-JQ1-Analoga mit den analogen, ebenfalls am Phenylring *ortho*-chlorsubstituierten Triazolobenzotriazepinen, wie z.B. **WRM251** (Abb. 5.1) von M. Wrobel, konnte somit durch die Einführung des Thiophenrings sowohl die Affinität als auch die Selektivität stark gesteigert werden.

Abbildung 5.1: Vergleichsmolekül

WRM251 von M. Wrobel.

- Der *para*-Methoxybenzylrest erwies sich als der geeignetste Substituent an N-6, da er bei den *o*-Cl-JQ1-Analoga sowohl zu hoher Selektivität als auch zu hoher Affinität führt. Als Leitstruktur für den letzten Abschnitt dieser Arbeit wurde daher, vor allem wegen der hohen Selektivität, die Verbindung **18** ausgewählt.

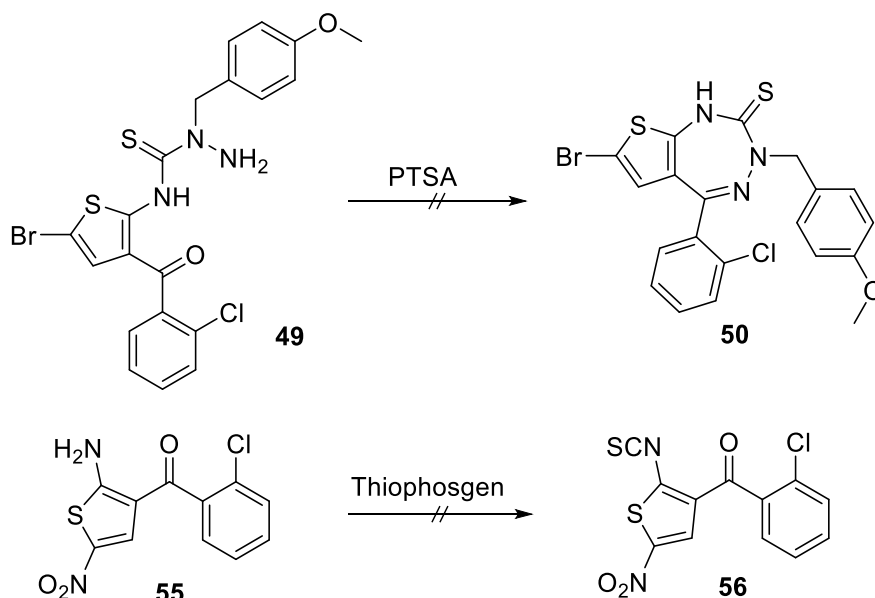
	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	LOC93349	PB1(5)	PCAF	ΔT_m (°C)	
															<0
															0-2
															2-4
															4-6
WRM251	-0,2	2,9	0,8	2,8	0,3	3,7	-0,7	0,3	0,1	-0,4	0,6	-0,1	-0,1		6-8
17	6,0	8,6	8,0	8,8	8,8	9,4	3,7	9,5	-0,6	-1,0		-0,3	-0,7		6-8
18	2,1	5,7	3,3	6,7	3,7	7,3	0,6	7,7	-0,2	-0,8		-0,2	0,0		>8

Tabelle 5.3: *Thermal Shift Assay*-Ergebnisse von **18** (ausgewählte Leitstruktur) aus der Reihe der *o*-Cl-JQ1-Analoga im Vergleich mit dem analog substituierten *p*-Cl-JQ1-Analoga **17** sowie dem Triazolobenzotriazepin **WRM251** von M. Wrobel.

Auf Basis dieser Ergebnisse der JQ1-Analoga mit dem aus **JQ1** übernommenen 2,3-Dimethylthiophen-Ring als typischem Strukturelement wurde für den letzten Abschnitt dieser Arbeit eine neue Zielverbindung entworfen, die ebenfalls einen Thiophenring enthält. Zudem sollte diese Struktur zwei der zuvor optimierten Strukturelemente enthalten, in Position 4 einen *ortho*-Chlorphenylrest und an N-6 einen *para*-Methoxybenzylrest. Die Untersuchungen zu den

Triazolobenzotriazepinen im ersten Teil der Arbeit hatten die Erkenntnis geliefert, dass eine Substitution des Benzenrings an C-8 oder C-9 mit polaren Resten, wie z.B. Aminen oder Harnstoffen, eine stark erhöhte Affinität bewirkt. Die Position 2 in den Triazolothienotriazepinen liegt auf Grund der unterschiedlichen Geometrie des Thiophens und des Benzens zwischen Position 8 und 9 bei Triazolobenzotriazepinen. An dieser Position 2 der Triazolothienotriazepine sollten daher polare Reste wie Amine, Amide und Harnstoffe eingefügt werden, um Hybride zu generieren, die alle zuvor optimierten Strukturelemente in sich vereinigen.

Als Intermediate für die Herstellung der Triazolothienotriazepine mit stickstoffhaltigen Substituenten an C-2 wurden zuerst Verbindungen mit einem Brom- bzw. Nitrosubstituenten am C-2 des Thiophenrings ins Auge gefasst, jedoch scheiterten diese Bemühungen an der Instabilität der Bromthiophen-Verbindung **49** bzw. der Reaktionsträgheit der Nitroverbindung **55** (Schema 5.4).

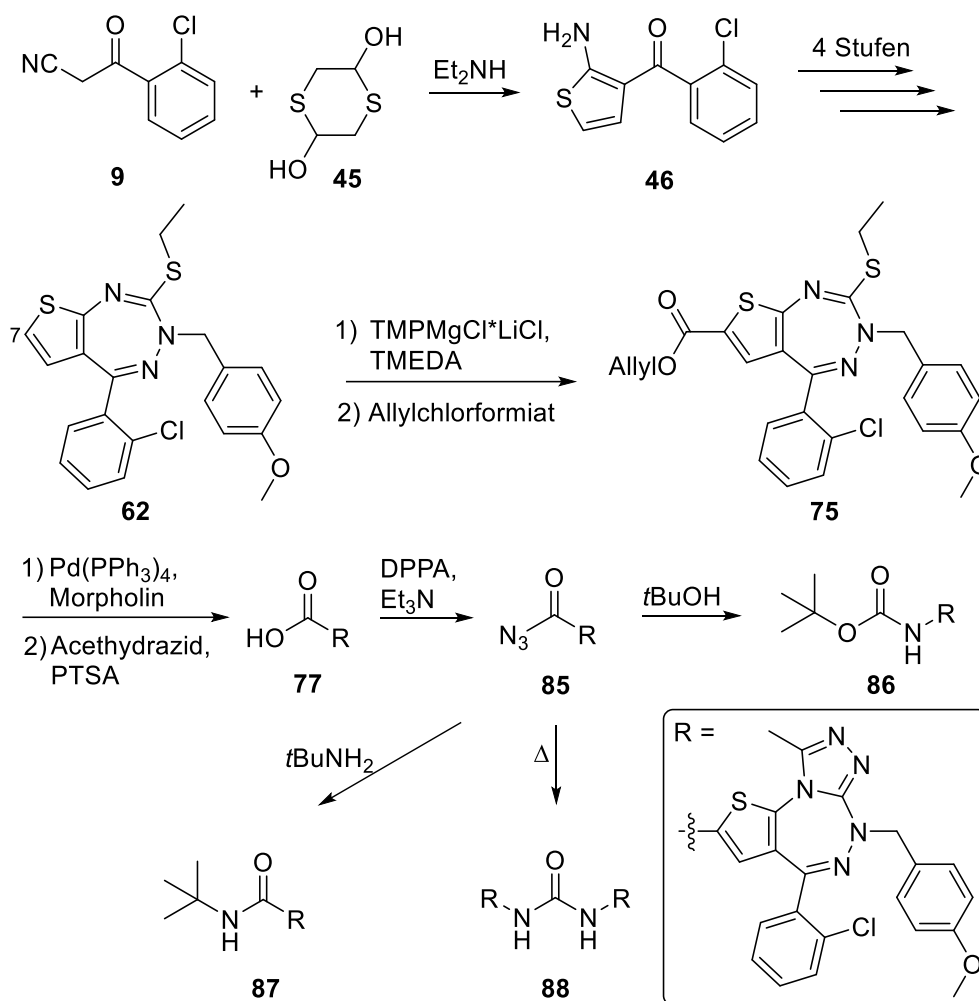


Schema 5.4: Erfolgreiche Ansätze zur Synthese von an C-2 mit polaren Resten versehenen Triazolothienotriazepinen.

Um die genannten Schwierigkeiten nach einer Bromierung oder Nitrierung zu umgehen, sollte in einem neuen Ansatz eine Synthese eines Triazolothienotriazepins mit an C-2 und C-3 unsubstituiertem Thiophenring erfolgen (Schema 5.5). Erst in einem späten Syntheseschritt sollte dann die Funktionalisierung an C-2 des Thiophenrings erfolgen.

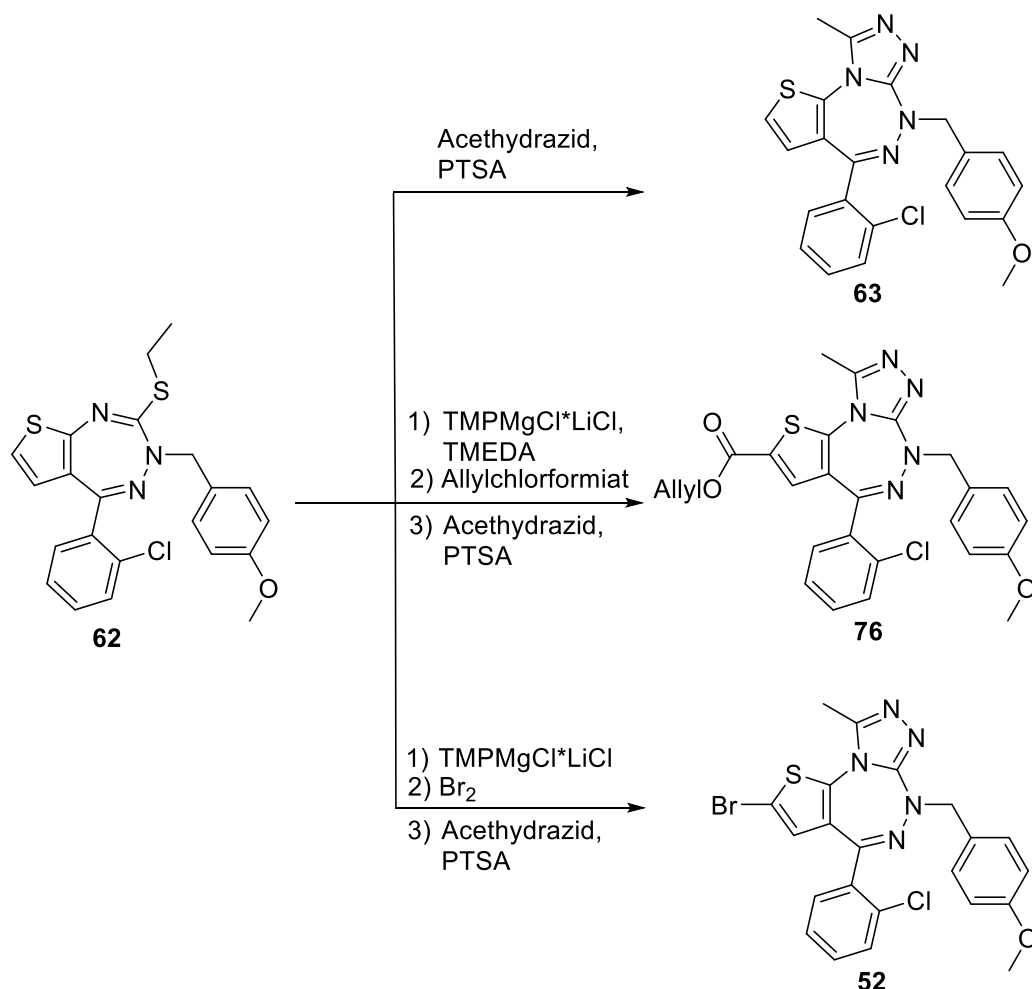
Das Thienotriazepin **62** ließ sich auf Basis der zuvor gewonnen Erkenntnisse in 5 Schritten herstellen. Mit $\text{TMPMgCl} \cdot \text{LiCl}$ gelang eine direkte Ringmetallierung an Position 7, gefolgt von einer Acylierung zum Allylester **75**. Nach Entschützung zur Carbonsäure durch eine Palladium-

katalysierte Übertragung des Allylrestes auf Morpholin konnte mittels Acethydrazid der Triazolring anelliert werden. Die Carbonsäuregruppe in **77** konnte mit Hilfe einer Curtius-Umlagerung in verschiedene polare Reste umgewandelt werden. Hierzu wurde mittels DPPA das Carbonsäureazid **85** hergestellt, welches sich in einem Arbeitsgang unter milden Bedingungen weiter zu dem Carbamat **86**, dem *tert*-Butylamid **87** und dem symmetrischen Harnstoff **88** umsetzen ließ.



Schema 5.5: Synthese der an C-2 substituierten Triazolothienotriazepine.

Aus dem Intermediat **62** ließ sich durch Cyclisierung mit Acethydrazid auch das 2,3-unsubstituierte Triazolothienotriazepin **63** herstellen. Die Synthese des Allylester-substituierten Triazolothienotriazepins **76** aus dem Intermediat **75** gelang wegen der Inkompatibilität der Estergruppe mit dem Reagenz Acethydrazid nur in schlechter Ausbeute (18 %). Metallierung von **62**, gefolgt von Bromierung und Anellierung des Triazolrings mit Acethydrazid lieferte doch noch das auf anderem Wege nicht zugängliche, begrenzt stabile 2-Bromtriazolothienotriazepin **52** (Schema 5.6).



Schema 5.6: Synthese weiterer Triazolothienotriazepine.

Die *Thermal Shift Assays* zeigten allerdings, dass diese Kombination von Strukturelementen nicht zu dem erwünschten Ziel führte. Weder die Affinität noch die Selektivität der Inhibitoren wurde gesteigert. Im Gegenteil, überraschenderweise wurde sowohl die Affinität als auch die Selektivität für die Bromodomänen stark vermindert.

Die erhaltenen Ergebnisse dieser Testung weisen darauf hin, dass die Methylgruppen an C-2 und C-3 der JQ1-Analoga (siehe Kapitel 3.4.7) eine wichtige Rolle für die Affinität zu den Bromodomänen spielen (Tabelle 5.4). Verbindung **63** ist sehr gut vergleichbar mit der

Leitstruktur **18** aus der Serie *o*-Cl-JQ1-Analoga, da bei **63** am Thiophenring nur die beiden Methylgruppen in Position 2 und 3 fehlen. Diese Strukturveränderung in **63** führte zu einem massiven Einbruch der Affinität, der auch nicht durch Substitution mit verschiedenen polaren Resten an C-2 (die in der Triazolobenzotriazepin-Reihe so affinitätssteigernd wirkten) wieder hergestellt werden konnte.

Die Carbonsäure **77** und das *tert*-Butylamid **87** weisen eine etwas höhere Affinität auf als die anderen an C-2 substituierten Verbindungen, jedoch geringere Affinitäten und vor allem kaum Selektivität an den jeweils zweiten Bromodomänen als die Vergleichssubstanz **18**.

	BRD2(1)	BRD2(2)	BRD3(1)	BRD3(2)	BRD4(1)	BRD4(2)	BRDT(1)	BRDT(2)	BAZ2B	CREBBP	PB1(5)	PCAF	ΔT_m (°C)	
18	2.1	5.7	3.3	6.7	3.7	7.3	0.6	7.7	-0.2	-0.8	-0.2	0.0		<0
63	2.3	4.8	2.8	4.1	2.2	4.7	0.7	5.5	0.6	0.0	0.7	2.3		0-2
77	2.9	5.7	4.2	4.7	4.6	5.4	1.6	4.9	-0.3	-0.3	-0.2	0.4		2-4
87	3.5	5.6	4.5	5.0	4.7	6.2	0.7	5.7	0.2	0.8	-0.2	0.8		4-6
														6-8

Tabelle 5.4: Ergebnisse des *Thermal Shift Assays* der Verbindungen **18** (Leitstruktur), **63**, **77** und **87**.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit die Entwicklung eines neuen, hochaffinen und selektiven Inhibitors zur jeweils zweiten Bromodomänen der BET-Proteine BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT. In mehreren Syntheseyklen wurden verschiedene Projekte zur Optimierung der Triazolobenzotriazepin-Inhibitoren unternommen. Zunächst erfolgten Variationen der Substitutionen in Position 8 und 9 von Triazolobenzotriazepinen. Zudem erfolgte eine Hybridisierung der Triazolobenzotriazepinstruktur mit dem bekannten Bromodomänen-Inhibitor **JQ1** vom Triazolothienodiazepin-Typ, die zu der hochaffinen und äußerst selektiven Verbindung **18** führte. Eine Kombination dieser optimierten Varianten führte in einem weiteren Syntheseyklus jedoch überraschenderweise nicht zu einer weiteren Verbesserung der Inhibitoreigenschaften. So verbleibt das Triazolothienotriazepin **18** als bester Inhibitor, da dieser eine gute Affinität und eine hervorragende Selektivität in sich vereint. Möglicherweise kann diese Substanz zur Aufklärung der Funktion der jeweils zweiten Bromodomäne von BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT beitragen.

6. Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Materialien

Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden in kommerziell verfügbarer p. a. Qualität benutzt. Lösungsmittel mit geringerer Qualität wurden durch Destillation gereinigt. Tetrahydrofuran wurde über Natrium-Benzophenon-Ketyl unter Rückfluss erhitzt und abdestilliert. Für die analytische HPLC wurden Lösungsmittel in HPLC grade verwendet, sowie bidest. Wasser. Die Chemikalien und Materialien wurden von Acros, Sigma Aldrich, TCI, VWR, GE, und Alfa Aesar bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Als stationäre Phase wurde DC Fertigfolien Polygram® SIL G/UV254nm von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet (Schichtdicke 0.2 mm, Format 40 × 80 mm) benutzt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm oder durch Reagenzienlösungen: 0.3 g Ninhydrin in 100 mL 1-Butanol; Ehrlich-Reagenz: 2 % Dimethylaminobenzaldehyd in 20 %iger wässriger Salzsäure.

Flash-Säulen-Chromatographie

Bei allen säulenchromatographischen Aufreinigungen wurde Kieselgel 60, Korngröße 0.040 - 0.063 mm, der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Außerdem wurden alle Säulen unter leichtem Druck durchgeführt. Die jeweilige Zusammensetzung des Elutionsmittels ist in Volumenteilen angegeben und bei der Beschreibung der Verbindungen zu finden.

Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit Hilfe eines Büchi-Melting Point B-540 Apparates (Büchi, Flawil, Schweiz). Alle angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

NMR-Spektren

Die NMR-Spektren (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC, HMBC) wurden mit folgenden Spektrometern aufgenommen: Jeol J NMR GX 400 (400 MHz), Jeol JNMR GX 500 (500 MHz) (beide von Jeol, Peabody, USA), Avance III HD 400 MHz Bruker Biospin und Avance III HD 500 MHz Bruker Biospin (beide von Bruker, Billerica, USA). Bei NMR-Spektren in CDCl_3 , CD_2Cl_2 , DMSO-D_6 und CD_3OD diente TMS als interner Standard.

IR-Spektren

Es wurde das IR-Spektrometer Perkin-Elmer FT-IR Paragon 1000 Spektrometer (PerkinElmer, Waltham, USA) oder Jasco FT/IR-410 (Jasco Inc., Easton, USA) genutzt. Feststoffe wurden mit Hilfe eines KBr-Presslings ölige Substanzen als Film zwischen zwei Natriumchlorid-Platten vermessen. Weitere Vermessungen mit ATR-Einheit erfolgten am IR-Gerät Jasco FT/IR-4100 mit ATR PRO450-S (Jasco Germany GmbH). Die ATR-Spektren wurden als KBr Spektren korrigiert.

Massenspektren

Die hochauflösenden Massenspektren (HRMS) wurden durch Elektronenstoß-Ionisation (EI) bei 70 eV Anregungsenergie oder mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) bestimmt. Hierbei wurden folgende Spektrometer eingesetzt: Jeol JMS-GCmate II (EI) (Jeol, Peabody, USA), Finnigan MAT 95 (EI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und Thermo Finnigan LTQ FT (ESI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Analytische HPLC

Die HPLC-Reinheiten wurden mit Hilfe einer HP Agilent 1100 HPLC mit Dioden Array Detektor (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und einer Agilent Poroshell Säule (120 EC-C18; 3.0 × 100 mm; 2.7 Micron) bestimmt.

Eluent: Acetonitril/Wasser (7:3), Acetonitril/Wasser/THF (700/298/2),
Acetonitril/Wasser/THF (800/198/2) oder Acetonitril/Wasser/THF/NaOH
(750/248/1.9/0.1).

Flussrate: 0.5 mL/min

Temperatur: 40 °C

Wellenlängen: 210 und 254 nm

Injektionsvolumen: 5 µL einer Lösung von 100 µg/mL (Probe in mobiler Phase)

Mikrowellen-unterstützte Synthesen

Die Synthesen wurden in den single-mode Mikrowellenreaktoren CEM Discover S-Class Plus SP (Matthews, USA) oder CEM Discover S-1856 (Matthews, USA) durchgeführt.

Software

Als Software wurden Microsoft Office 2013 (Microsoft, Redmond, USA), MestReNova 9.1.0 (Mestrelab, Santiago de Compostela, Spanien) und ChemBioDraw Ultra 14.0 (CambridgeSoft, Cambridge, UK) verwendet.

5.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV1: Synthese der Isothiocyanate (12/13)

1.5 Äq. Calciumcarbonat werden in einem Gemisch aus Wasser (50 mL/mmol Edukt) und Ethanol (5 mL/mmol) suspendiert und auf -10 °C gekühlt, dann werden 2.2 Äq. Thiophosgen dieser Suspension zugesetzt. In 2.5 mL/mmol Dichlormethan wird 1.0 Äq. 2-Aminobenzoylthiophen gelöst und diese Lösung über einen Zeitraum von mindestens 30 min zu der stark gerührten Suspension zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wird die Kühlung beendet und die Reaktion 30 min bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die organische Phase wird separiert und die wässrige Phase wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Weitere Aufreinigungsschritte sind nicht erforderlich.

AAV2: Synthese der Benzo-/Thienotriazepinthione (15/16/29)

Zu einer eisbadgekühlten Lösung von 1.1 Äq. Methoxybenzylhydrazin-Hydrochlorid in Methanol (3 mL/mmol) werden 1.2 Äq. *N,N*-Diisopropylethylamin zugetropft. Danach wird das Eisbad entfernt und weitere 30 min bei Raumtemperatur gerührt. 1.0 Äq. Chlorphenyl(2-isothiocyanato-4,5-dimethyl-3-thienyl)methanon werden in Tetrahydrofuran (3 mL/mmol) gelöst und zu der obigen Lösung zugefügt. Nachdem die Lösung 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über Kieselgel filtriert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels wird das Zwischenprodukt in Ethylacetat (5 mL/mmol) gelöst und mit einer katalytischen Menge (10 mol%) an *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt. Die Lösung wird 1 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt anschließend durch Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 6:1) aufgereinigt.

AAV3: Aufbau der Triazolringe (17/18)

1.0 Äq. der S-Ethyl-Verbindung wird in Butan-1-ol (0.325 mL/mmol) gelöst. 3.0 Äq. Acethydrazid und 30 mol% *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat werden zugefügt. Die Lösung wird 1.5 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wird nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97.5:2.5). aufgereinigt.

AAV4: Synthese der Isothiocyanate (27/48/59)

Eine Lösung von 1.0 Äq. (2-Aminophenyl)/(2-Aminothieryl)-(phenyl)methanon in 2.0 mL/mmol Dichlormethan wird zu einem eisgekühlten, stark gerührten Gemisch aus 50 mL/mmol Wasser, 1.5 Äq. Calciumcarbonat und 2.2 Äq. Thiophosgen zugetropft. Nach 1 h Rühren bei 0 °C gefolgt von 1 - 4 h bei Raumtemperatur wird die Suspension dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat/Isohexan 10:1) aufgereinigt.

AAV5: Buchwald-Hartwig-Reaktionen: Pd-katalysierte Kupplung des 9-Bromtriazolobenzotriazepins 30 mit Sulfonamiden oder Amiden (31a-c)

Ein Schlenkkolben wird mit 2 mg (2 mol %) Pd₂(dba)₃, 4 mg (6 mol %) Xantphos, 51 mg (0.10 mmol) 9-Brom-6-(2-chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**30**), 0.120 mmol (Sulfon-)Amid und 46 mg (0.14 mmol) Cäsiumcarbonat unter Stickstoffatmosphäre befüllt. 0.5 mL 1,4-Dioxan werden zugefügt und die Suspension mehrere Stunden unter Stickstoff bei 100 °C erhitzt, bis das Arylbromid vollständig umgesetzt ist (DC-Kontrolle). Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur gekühlt und mit 50 mL Ethylacetat versetzt. Das Gemisch wird nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das

Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

AAV6: S-Ethylierung der Thioharnstoffe (39/40)

1.0 Äq. Triazepin-2-thion wird in trockenem Tetrahydrofuran (3.0 mL/mmol) gelöst. Nach Zugabe von 1.5 Äq. KOH als Feststoff und 1.5 Äq. Ethyliodid wird die Lösung 1 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit Wasser versetzt und das Gemisch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Isohexan/Ethylacetat 20:1) aufgereinigt.

AAV7: Entschützen der *p*-Methoxybenzyl-geschützten Triazolotriazepine (41/42)

1.0 Äq. *p*-Methoxybenzyl-geschützten Triazolotriazepin und 2.0 Äq. Anisol werden in Bromwasserstofflösung 33 Gew.% in Eisessig (4.55 mL/mmol Edukt) gelöst. Die Lösung wird 2 h auf 50 °C erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand wieder in Tetrahydrofuran (4.55 mL/mmol) aufgenommen. Nach Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung (4.55 mL/mmol) wird das Reaktionsgemisch 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97.5:2.5) aufgereinigt.

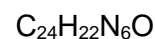
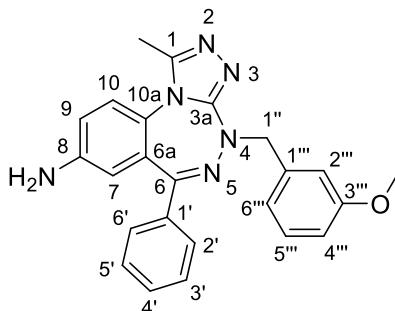
AAV8: N-Alkylierung von Triazolothienotriazepinen (17 oder 18) mit unterschiedlich substituierten Benzylhalogeniden (43a-f und 44a-f)

50 mg (0.15 mmol) Triazolothienotriazepin (**17** oder **18**) werden in 0.5 mL Tetrahydrofuran gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 6 mg (0.2 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Dann werden 3.0 Äq. (0.45 mmol) des Benzylhalogenids zugetropft. Falls das Benzylhalogenid ein Feststoff ist, wird dieser zuvor in 1 mL Tetrahydrofuran gelöst. Die Suspension wird 2 - 4 h auf 50 °C erwärmt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1 bis 98:2) aufgereinigt.

AAV9: Aufbau der Triazolringe (52/63/178/77)

In einem Mikrowellenvial werden 1.0 Äq. 5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepinanalogen (**51/62/73**), 3.0 Äq. Acethydrazid und 0.5 Äq. *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 5.0 mL/mmol Dimethylsulfoxid gelöst und 2 h bei 120 °C, 300 W und einem maximalen Druck von 9 bar im Mikrowellenreaktor erhitzt. Die Lösung wird auf Raumtemperatur gekühlt, in Wasser gegeben und das Gemisch dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung wird die Lösung über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie wird das Produkt aufgereinigt.

5.3 Synthesevorschriften

8-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]-triazepin (**2**)

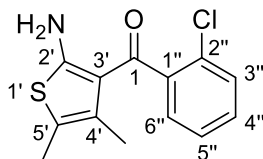
$$M = 410.98 \text{ g/mol}$$

550 mg (1.25 mmol) 4-(3-Methoxybenzyl)-1-methyl-8-nitro-6-phenyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**WRM248**) werden in 25 mL eines Lösungsmittelgemisches Ethanol/Wasser (2:1) suspendiert. Dann werden 349 mg (6.25 mmol) Eisenpulver und 33 mg (0.63 mmol) Ammoniumchlorid zugefügt und das Reaktionsgemisch 0.5 h auf 80 °C erhitzt. Die Suspension wird filtriert und der Rückstand mit Ethylacetat nachgewaschen. Das erhaltene Filtrat wird mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gelbe ölige Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (100 % Ethylacetat) aufgereinigt. Es werden 490 mg, (1.22 mmol, 97 %) **2** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 163.2 - 164.5 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.46 - 7.37 (m, 3H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 7.36 - 7.30 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.22 (dd, ³J = 8.3 Hz, 7.5 Hz, 1H, 5'''-H), 7.13 (d, ³J = 8.7 Hz, 1H, 10-H), 6.99 (ddd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1.0 Hz, 1H, 6'''-H), 6.95 (dd, ⁴J = 2.6 Hz, 1.7 Hz, 1H, 2'''-H), 6.88 (dd, ³J = 8.7 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, 9-H), 6.79 (ddd, ³J = 8.3 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 6.44 (d, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, 7-H), 5.06 (d, ²J = 14.1 Hz, 1H, 1''-H), 4.83 (d, ²J = 14.1 Hz, 1H, 1''-H), 3.98 (s, 2H, NH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.50 (s, 3H, 1-CH₃).

^{13}C-NMR (100 MHz, CD_2Cl_2):	δ (ppm) = 162.6 (C-6), 160.0 (C-3''', C-3a), 148.6 (C-1), 145.8 (C-8), 139.8 (C-1'''), 137.3 (C-1'), 130.3 (C-4'), 130.1 (C-6a), 129.6 (C-2', C-6'), 129.5 (C-5'''), 128.55, 128.5 (C-3', C-5'), 125.6 (C-10a), 123.9 (C-10), 121.6 (C-6'''), 117.8 (C-9), 116.6 (C-7), 114.8 (C-2'''), 113.0 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH_3), 12.7 (1-CH_3).
IR (KBr):	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3443 m, 3335 m, 3210 m, 3056 w, 2932 w, 2833 w, 1626 m, 1603 s, 1585 m, 1521 s, 1507 m, 1490 m, 1446 m, 1380 w, 1342 m, 1313 m, 1265 s, 1147 m, 1038 m, 777 m, 694 m.
MS (ESI+):	$m/z = 411$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 411.1926$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}^+$ 411.1933).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 1.879 min, 94 %.
DC:	R_f (EA) = 0.30

(2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(2-chlorophenyl)methanon (11)C₁₃H₁₂ClNOS

M = 265.76 g/mol

2.48 g (13.8 mmol) 2-Chlorbenzoylacetonitril (**9**), 1.24 mL (13.9 mmol) Butan-2-on, und 1.20 mL (13.8 mmol) Morpholin werden in 40 mL Ethanol gelöst. 440 mg (13.7 mmol) Schwefel werden bei Raumtemperatur als Feststoff zugesetzt. Die Suspension wird 12 h auf 70 °C erhitzt. Anschließend wird die Lösung auf Raumtemperatur gekühlt und in gesättigte Kochsalzlösung gegeben. Das Gemisch wird dreimal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 6:1) aufgereinigt und 2.66 g (10.0 mmol, 72 %) **11** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 146.7 - 148.1 °C (Lit.: 151 - 152 °C)^[165]

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.47 - 7.14 (m, 6H, 3'''-H, 4'''-H, 5'''-H, 6'''-H, NH₂), 2.08 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 5'-CH₃), 1.37 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 4'-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 189.6 (C=O), 166.2 (C-2'), 142.1 (C-2'', Cq_{ar}), 130.4 (C-1'' Cq_{ar}), 130.4 (C-4'', CH_{ar}), 129.9 (C-3'', CH_{ar}), 128.7 (C-5'), 128.2 (C-6'', CH_{ar}), 127.3 (C-5'', CH_{ar}), 116.4 (C-3'), 114.6 (C-4'), 13.9 (4'-CH₃), 12.6 (5'-CH₃).

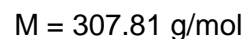
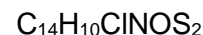
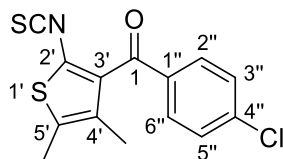
IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3363 m, 3263 m, 3138 w, 2965 w, 2924 w, 1572 s, 1422 s, 1325 w, 1288 m, 1134 w, 1051 w, 1030 w, 968 w, 908 w, 761 m, 742 m, 695 m.

MS (ESI+): m/z = 268, 266 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): $m/z = 266.0401$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{13}H_{13}CINOS^+$ 266.0406).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.504 min, 95 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.18

(4-Chlorphenyl)(2-isothiocyanato-4,5-dimethyl-3-thienyl)methanon (12)

Die Synthese des Isothiocyanats folgt der AAV1. 660 mg (2.48 mmol) (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(4-chlorphenyl)methanon (**10**) werden in 6.25 mL Dichlormethan gelöst und diese Lösung zu einer gekühlten Suspension aus 373 mg (3.72 mmol) Calciumcarbonat und 413 μL (5.38 mmol) Thiophosgen in einem Gemisch aus 125 mL Wasser und 12.5 mL Ethanol getropft. 763 mg (2.48 mmol, 100 %) **12** werden als braunes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm) = 7.77 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.50 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H, 3''-H, 5''-H), 2.33 (d, $^5J = 0.8$ Hz, 3H, 5'-CH₃), 2.02 (d, $^5J = 0.8$ Hz, 3H, 4'-CH₃).

(400 MHz, CD₂Cl₂):

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm) = 190.3 (C-1), 140.3 (C-4''), 138.9 (N=C=S), 136.3 (C-1''), 135.8 (C-3'), 132.0 (C-5'), 131.7 (C-4'), 131.5 (C-2'', C-6''), 129.5 (C-3'', C-5''), 128.9 (C-2'), 13.3 (5'-CH₃), 13.1 (4'-CH₃).

(100 MHz, CD₂Cl₂):

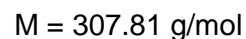
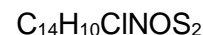
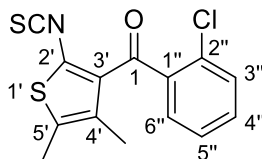
IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3282 w, 2922 w, 2856 w, 2099 s, 1654 s, 1586 s, 1569 w, 1524 w, 1484 m, 1460 m, 1400 m, 1370 m, 1285 s, 1217 m, 1167 m, 1088 s, 1013 w, 975 w, 912 w, 855 m, 841 m, 791 w, 765 w, 730 w.

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 309 (46), 308 (53), 307 [M]⁺⁺ (100), 306 (83), 272 (98), 196 (25).

HR-MS (EI): m/z = 306.9891 [M]⁺⁺ (berechnet für C₁₄H₁₀ClNOS₂⁺⁺ 306.9892).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 4.674 min, 96 %.

DC: R_f (Ethylacetat / Isohexan 6:1) = 0.59

(2-Chlorphenyl)(2-isothiocyanato-4,5-dimethylthiophen-3-yl)methanon (13)

Zur Synthese des Isothiocyanats wird AAV1 befolgt. 2.50 g (9.41 mmol) (2-Amino-4,5-dimethylthiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (**11**) werden in 25 mL Dichlormethan gelöst und zu einer gekühlten Suspension aus 1.41 g (1.41 mmol) Calciumcarbonat und 1.6 mL (21 mmol) Thiophosgen, 400 mL Wasser und 40 mL Ethanol getropft. Es werden 2.89 g (9.40 mmol, 99 %) **13** als braunes Öl werden erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.51 - 7.39 (m, 4H, 3''-H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 2.32 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 5'-CH₃), 2.16 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 4'-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 189.4 (C=O), 139.4 (C-2'', Cq_{ar}), 137.8 (N=C=S), 134.8 (C-3'), 132.6 (C-4'', CH_{ar}), 132.4 (C-5'), 131.8 (C-1'', Cq_{ar}), 131.0 4 (C-4'), 130.8 (C-3'', CH_{ar}), 130.1 (C-6'', CH_{ar}), 127.8 (C-5'', CH_{ar}), 127.3 (C-2', Cq_{ar}), 13.5 (4'-CH₃), 13.2 (5'-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3061 w, 2965 w, 2923 m, 2856 w, 2101 s, 1655 s, 1588 w, 1516 w, 1469 m, 1434 m, 1384 w, 1370 m, 1292 m, 1214 w, 1087 w, 1049 w, 916 w, 857 w, 752 m.

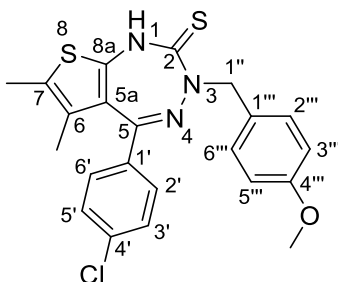
MS (ESI+): m/z = 310, 308 [M+H]⁺, 294, 292, 266.

HR-MS (ESI+): m/z = 307.9965 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₄H₁₁ClNOS₂⁺ 307.9971).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 3.923 min, 86 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.56

5-(4-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-1,3-dihydro-2H-thieno[2,3-e]-[1,2,4]triazepin-2-thion (15)



M = 441.99 g/mol

Eine Lösung aus 3.12 g (16.56 mmol) *p*-Methoxybenzylhydrazin-Hydrochlorid (**14**) und 3.07 mL (18.06 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin in 45 mL Methanol wird, wie im Detail in AAV2 beschrieben, hergestellt. 4.63 g (15.05 mmol) (4-Chlorphenyl)(2-isothiocyanato-4,5-dimethyl-3-thienyl)methanon (**12**) werden in 45 mL Tetrahydrofuran gelöst und der methanolischen Lösung zugefügt. AAV2 wird weiter befolgt und 3.64 g (8.23 mmol, 55 %) **15** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 99.9 - 102.0 °C (Lit.: 108 - 110 °C)^[98]

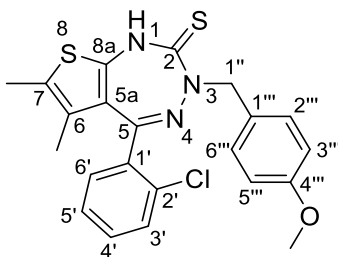
¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.13 (s, 1H, NH), 7.31 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.26 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.13 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.84 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 5.15 (bs, 2H, 1''-H), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.24 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 7-CH₃), 1.43 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 6-CH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 193.6 (C=S), 166.5 (C-5), 159.4 (C-4'''), 147.0 (C-8a), 137.1 (C-4'), 134.2 (C-1'), 130.5 (C-2', C-6'), 130.2 (C-2'', C-6'''), 129.3 (C-7), 129.2 (C-1'''), 129.1 (C-3', C-5'), 126.6 (C-6), 125.7 (C-5a), 114.0 (C-3'', C-5'''), 58.9 (C-1''), 55.6 (OCH₃), 13.9 (6-CH₃), 12.9 (7-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3167 m, 2960 m, 2923 m, 2834 w, 1611 w, 1591 m, 1569 w, 1512 s, 1487 s, 1438 w, 1399 m, 1317 m, 1248 s, 1173 s, 1090 m, 1034 w, 1011 m, 836 m, 756 m, 718 w.

MS (ESI-):	$m/z = 442, 440 [M-H]^-$, 293, 291.
HR-MS (ESI-):	$m/z = 440.0662 [M-H]^-$ (berechnet für $C_{22}H_{19}ClN_3OS_2^-$ 440.0658).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 3.736 min, > 99 %.
DC:	R_f (Isohexan/Ethylacetat 3:1) = 0.23

5-(2-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-1,3-dihydro-2H-thieno[2,3-e]-[1,2,4]triazepin-2-thion (16)



M = 441.99 g/mol

Eine Lösung aus 1.95 g (10.3 mmol) *p*-Methoxybenzylhydrazin-Hydrochlorid (**14**) und 1.92 mL (11.3 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin in 30 mL Methanol wird, wie in AAV2 beschrieben, hergestellt. 2.98 g (9.40 mmol) (4-Chlorphenyl)(2-isothiocyanato-4,5-dimethyl-3-thienyl) methanon (**13**) werden in 30 mL Tetrahydrofuran gelöst und zur methanolischen Lösung getropft. Es wird AAV2 befolgt und 1.29 g (2.92 mmol, 31 %) **16** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 72.1 - 73.5 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.02 (s, 1H, NH), 7.36 - 7.34 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.31 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.25 - 7.19 (m, 1H, 5'-H), 6.86 (d, ³J = 8.8 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.80 (d, ³J = 7.4 Hz, 1H, 6'-H), 5.15 (bs, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 2.19 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 7-CH₃), 1.29 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 6-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 193.6 (C=S), 166.0 (C-5), 159.4 (C-4'''), 146.7 (C-8a), 134.9 (C-1'), 133.5 (C-2'), 131.8 (C-6'), 131.5 (C-4'), 130.4 (C-3'), 130.2 (C-2'', C-6''), 129.6 (C-7), 129.4 (C-1'''), 127.3 (C-5'), 126.4 (C-5a), 125.6 (C-6), 114.0 (C-3'', C-5''), 59.0 (C-1''), 55.6 (OCH₃), 12.7 (6-CH₃), 12.6 (7-CH₃).

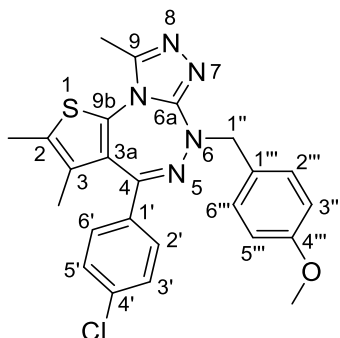
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3171 m, 2981 m, 2933 w, 2860 w, 1709 w, 1611 w, 1591 m, 1569 m, 1513 s, 1435 m, 1397 w, 1320 m, 1301 w, 1248 s, 1180 s, 1085 w, 1035 m, 999 w, 853 w, 828 w, 755 s, 666 w.

MS (ESI-): m/z = 442, 440 [M-H]⁻, 293, 291.

HR-MS (ESI-): $m/z = 440.0662$ $[M-H]^-$ (berechnet für $C_{22}H_{19}ClN_3OS_2^-$ 440.0658).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.878 min, 88 %.

**4-(4-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo-
[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (17)**



$C_{24}H_{22}ClN_5OS$

$M = 463.98 \text{ g/mol}$

AAV3 wird befolgt und hierzu werden 1.30 g (2.77 mmol) 5-(4-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin (**39**), 616 mg (8.32 mmol) Acethydrazid und 180 mg (0.946 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 9.0 mL Butan-1-ol gelöst. 708 mg (1.53 mmol, 55 %) **17** werden als hellbrauner Feststoff erhalten.

(Literaturbekannte Verbindung, andere Synthesemethode.^[98])

Schmelzpunkt: 107.1 - 108.4 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂):
 δ (ppm) = 7.37 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.34 - 7.28 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 6.86 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 5.02 (d, $^2J = 13.6 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 4.77 (d, $^2J = 13.6 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 2.57 (s, 3H, 9-CH₃), 2.35 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.53 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂):
 δ (ppm) = 160.2 (C-4), 159.3 (C-6a), 159.2 (C-4'''), 148.2 (C-9), 136.5 (C-4'), 135.0 (C-1'), 133.7 (C-9b), 130.9 (C-2''', C-6'''), 130.8 (C-2), 130.7 (C-3), 130.1 (C-2', C-6'), 129.8 (C-1'''), 129.4 (C-3a), 129.0 (C-3', C-5'), 113.9 (C-3''', C-5'''), 57.5 (C-1''), 55.6 (OCH₃), 14.3 (3-CH₃), 13.2 (2-CH₃), 12.5 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3065 w, 2965 s, 2862 m, 2836 m, 2474 w, 2059 w, 1911 w, 1613 m, 1588 m, 1537 s, 1514 s, 1421 s, 1381 w, 1301

m, 1250 s, 1174 m, 1091 m, 1035 m, 1014 m, 962 w, 900 w, 836 m, 753 s, 665 m.

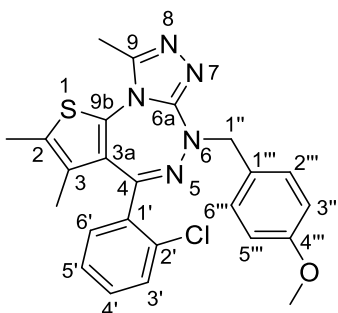
MS (ESI+): $m/z = 466, 464 [M+H]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 464.1302 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{24}H_{23}ClN_5OS^+$ 464.1312).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.087 min, 91 %.

DC: R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97.5:2.5) = 0.22

4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo-[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (18**)**



$C_{24}H_{22}ClN_5OS$

$M = 463.98 \text{ g/mol}$

Nach AAV3 werden 870 mg (1.85 mmol) 5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin (**40**), 411 mg (5.55 mmol) Acethydrazid und 120 mg (0.631 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 6.0 mL Butan-1-ol gelöst. Nach Aufreinigung werden 521 mg (1.12 mmol, 61 %) **18** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 99.0 - 101.0 °C

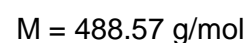
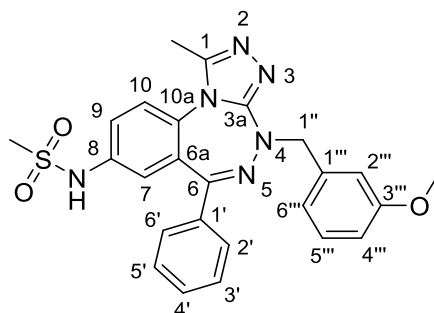
$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.38 (d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.36 - 7.31 (m, 2H, 5'-H, 6'-H), 7.31 - 7.24 (m, 1H, 4'-H), 7.20 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 1H, 3'-H), 6.87 (d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 4.90 (s, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 2.57 (s, 3H, 9- CH_3), 2.30 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2- CH_3), 1.41 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 159.7 (C-4), 159.3 (C-4'''), 159.0 (C-6a), 148.2 (C-9), 135.6 (C-2'), 133.5 (C-9b), 133.2 (C-1'), 131.9 (C-3'), 131.2 (C-6'), 131.0 (C-2'', C-6''), 130.7 (C-3), 130.6 (C-2), 130.4 (C-5'), 129.8 (C-3a), 129.7 (C-1'''), 127.4 (C-4'), 113.8 (C-3'', C-5''), 57.5 (C-1''), 55.6 (OCH_3), 13.1 (3- CH_3), 13.0 (2- CH_3), 12.6 (9- CH_3).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3057 w, 2921 m, 2834 w, 1647 w, 1612 m, 1589 m, 1567 m, 1513 s, 1421 s, 1362 w, 1248 s, 1174 m, 1035 m, 961 w, 826 w, 763 m, 737 m.

MS (ESI+):	$m/z = 466, 464 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 464.1303 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{24}H_{23}ClN_5OS^+$ 464.1312).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 1.778 min, 94 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.43

***N*-(4-(3-Methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-8-yl)methansulfonamid (21a)**



75 mg (0.18 mmol) 8-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**2**) werden in 2.0 mL Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 24 µL (0.30 mmol) Pyridin versetzt. Nach Zugabe von 22 µL (0.29 mmol) Methansulfonylchlorid wird das Eisbad entfernt und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 50 mL Dichlormethan versetzt und das Gemisch mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 63 mg (0.13 mmol, 70 %) **21a** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 230.6 - 232.6 °C

¹H-NMR
(400 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 10.12 (s, 1H, NH), 7.73 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 7.53 (dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, 9-H), 7.51 - 7.39 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.24 (dd, ³*J* = 8.3 Hz, 7.6 Hz, 1H, 5'''-H), 7.01 (d, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, 7-H), 6.96 (ddd, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, 6'''-H), 6.93 (dd, 1H ⁴*J* = 2.7 Hz, 1.5 Hz, 2'''-H), 6.83 (ddd, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.7 Hz, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 4.99 (d, ²*J* = 14.1 Hz, 1H, 1''-H), 4.78 (d, ²*J* = 14.1 Hz, 1H, 1''-H), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.04 (s, 3H, SO₂-CH₃), 2.53 (s, 3H, 1-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 161.6 (C-6), 159.0 (C-3'''), 158.7 (C-3a), 148.5 (C-1), 138.7 (C-1'''), 136.8 (C-8), 135.9 (C-1'), 130.3 (C-4'), 129.6 (C-10a), 129.2 (C-5'''), 129.0 (C-3', C-5'), 128.8 (C-6a), 128.3

(C-2', C-6'), 124.2 (C-10), 122.1 (C-9), 120.8 (C-6'''), 120.3 (C-7), 114.1 (C-2'''), 112.5 (C-4'''), 56.8 (C-1''), 54.8 (OCH₃), 39.5 (SO₂CH₃), 11.9 (1-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3433 m, 3050 m, 2918 m, 2850 w, 2835 w, 1600 m, 1586 m, 1526 s, 1505 m, 1490 m, 1466 w, 1386 w, 1333 s, 1266 m, 1231 w, 1157 s, 1050 w, 965 w, 779 w, 695 w.

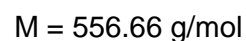
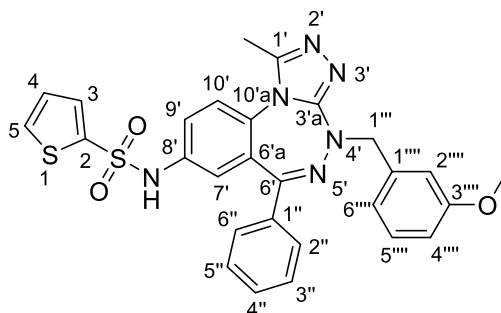
MS (ESI+): m/z = 511 [M+Na]⁺, 489 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 489.1701 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₅H₂₅N₆O₃S⁺ 489.1709).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.663 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 97:3) = 0.15

***N*-(4-(3-Methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-8-yl)thiophen-2-sulfonamid (21b)**



75 mg (0.18 mmol) 8-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**2**) werden in 2.0 mL Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 24 µL (0.30 mmol) Pyridin versetzt. Nach Zugabe von 53 mg (0.29 mmol) Thiophen-2-sulfonylchlorid, wird das Eisbad entfernt und 14 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 50 mL Dichlormethan versetzt und das Gemisch mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach Aufreinigung mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) werden 83 mg (0.15 mmol, 81 %) **21b** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 202.3 - 204.1 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 10.78 (s, 1H, NH), 7.99 (dd, ³*J* = 5.0 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, 5-H), 7.70 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 1H, 10'-H), 7.52 - 7.38 (m, 5H, 3-H, 9'-H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.28 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 2H, 2''-H, 6''-H), 7.24 (dd, ³*J* = 8.3 Hz, 7.8 Hz, 1H, 5'''-H), 7.17 (dd, ³*J* = 5.0 Hz, 3.8 Hz, 1H, 4-H), 6.93 - 6.88 (m, 3H, 7'-H, 2'''-H, 6'''-H), 6.83 (ddd, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.6 Hz, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 4.97 (d, ²*J* = 14.2 Hz, 1H, 1'''-H), 4.76 (d, ²*J* = 14.2 Hz, 1H, 1'''-H), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.50 (s, 3H, 1'-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 161.5 (C-6'), 159.0 (C-3'''), 158.7 (C-3'a), 148.5 (C-1'), 139.1 (C-2), 138.7 (C-1'''), 135.8 (C-8'), 135.6 (C-1''), 133.9 (C-5), 132.6 (C-3), 130.4 (C-10'a), 130.3 (C-4''), 129.2

(C-5'''), 128.8 (C-2'', C-6''), 128.7 (C-6'a), 128.4 (C-3'', C-5''), 127.7 (C-4), 124.2 (C-10'), 123.4 (C-9'), 121.1 (C-7'), 120.6 (C-6'''), 114.0 (C-2'''), 112.5 (C-4'''), 56.6 (C-1'''), 54.8 (OCH₃), 11.9 (1'-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3423 m, 3090 w, 4070 w, 3054 m, 2919 m, 2832 w, 2755 w, 1909 w, 1600 m, 1566 w, 1526 s, 1504 m, 1490 m, 1465 m, 1444 m, 1380 w, 1335 s, 1261 m, 1229 m, 1161 s, 1091 w, 1041 w, 780 w, 717 m, 593 m.

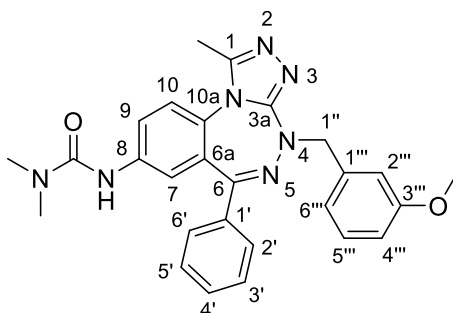
MS (ESI+): m/z = 579 [M+Na]⁺, 557 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 557.1421 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₈H₂₅N₆O₃S₂⁺ 557.1430).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.466 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 97:3) = 0.24

3-(4-(3-Methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-8-yl)-1,1-dimethylharnstoff (21c)



$$\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_2$$

$$M = 481.56 \text{ g/mol}$$

75 mg (0.18 mmol) 8-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**2**) werden in 1.0 mL trockenem Dimethylsulfoxid gelöst und mit 78 μL (0.57 mmol) Triethylamin versetzt. Dann werden 52 μL (0.56 mmol) Dimethylcarbamoylchlorid zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in gesättigte Kochsalzlösung gegeben. Das Gemisch wird dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 18 mg (0.037 mmol, 21 %) **21c** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 141.5 - 142.0 °C

^1H -NMR
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.84 (dd, $^3J = 8.9 \text{ Hz}$, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H), 7.46 - 7.37 (m, 3H, 2'-H, 4'-H, 6'-H), 7.36 - 7.30 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.26 (d, $^3J = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, 10-H), 7.22 (dd, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, 7.5 Hz, 1H, 5'''-H), 7.14 (d, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 7.99 (ddd, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, $^4J = 1.3 \text{ Hz}$, 1.0 Hz, 1H, 6'''-H), 6.95 (ddd, 1H, $^4J = 2.7 \text{ Hz}$, 1.3 Hz, 2'''-H), 6.82 (s, 1H, NH), 6.79 (ddd, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, $^4J = 2.7 \text{ Hz}$, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 5.06 (d, $^2J = 14.0 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 4.83 (d, $^2J = 14.0 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 2.92 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.53 (s, 3H, 1- CH_3).

^{13}C -NMR
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 162.4 (C-6), 160.2 (C-3a), 160.0 (C-3), 155.5 (C=O), 148.7 (C-1), 139.7 (C-1'''), 138.9 (C-8), 137.1 (C-1'), 130.4 (C-

4'), 129.6 (C-2', C-6'), 129.5 (C-5'''), 129.4 (C-6a), 129.3 (C-10a), 128.6 (C-3', C-5'), 123.3 (C-10), 123.1 (C-9), 121.8 (C-7), 121.6 (C-6'''), 114.8 (C-2'''), 113.0 (C-4'''), 58.0 (C-1''), 55.5 (OCH₃), 36.6 (N(CH₃)₂), 12.8 (1-CH₃).

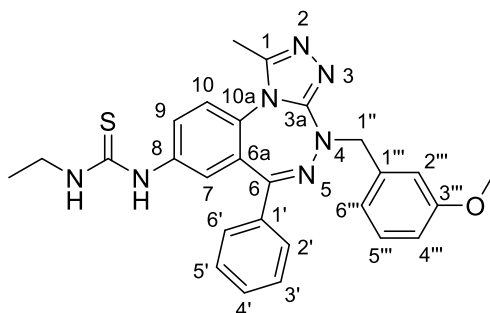
IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3314 w, 2923 m, 2854 w, 2257 w, 1658 s, 1602 w, 1586 w, 1534 s, 1515 s, 1490 m, 1434 w, 1398 w, 1318 w, 1266 m, 1237 w, 1184 w, 1154 w, 1042 m, 747 w.

MS (ESI+): m/z = 504 [M+Na]⁺, 482 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 482.2297 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₇H₂₈N₇O₂⁺ 482.2304).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.858 min, 98 %.

1-Ethyl-3-(4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-8-yl)thioharnstoff (21d)



$C_{27}H_{27}N_7OS$

$M = 497.62 \text{ g/mol}$

75 mg (0.18 mmol) 8-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**2**) werden in 1.5 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 8 mg (0.2 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Die Suspension wird 10 min gerührt und anschließend 49 µL (0.56 mmol) Ethylisothiocyanat zugetropft. Das Eisbad wird entfernt und 1.0 mL trockenes Dimethylsulfoxid zugesetzt und die Suspension 3 h auf 50 °C erwärmt. Das Gemisch wird auf Raumtemperatur gekühlt, mit 50 mL Ethylacetat versetzt und mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend durch Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 19 mg (0.038 mmol, 21 %) **21d** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 161.9 - 162.4 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 9.70 (s, 1H, Et-NH), 7.93 (s, 1H, 8-NH), 7.89 (dd, ³*J* = 8.8 Hz, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, 9-H), 7.67 (d, ³*J* = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 7.49 - 7.37 (m, 5H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.29 (d, ⁴*J* = 2.5 Hz, 1H, 7-H), 7.24 (dd, ³*J* = 8.3 Hz, 7.8 Hz, 1H, 5'''-H), 6.99 - 6.88 (m, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 6.82 (ddd, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.8 Hz, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 4.99 (d, ²*J* = 14.1 Hz, 1H, 1''-H), 4.77 (d, ²*J* = 14.1 Hz, 1H, 1''-H), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.47 - 3.40 (m, 1.6H, CH₃CH₂-Rotamer), 3.01 - 2.95 (m, 0.4H, CH₃CH₂-Rotamer), 2.53 (s, 3H, 1-CH₃), 1.07 (t, ³*J* = 7.1 Hz,

2.4H, CH₃CH₂-Rotamer), 0.97 (t, ³J = 7.1 Hz, 0.6H, CH₃CH₂-Rotamer).

**¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂):**

δ (ppm) = 180.0 (C=S), 161.7 (C-6), 159.0 (C-3'''), 158.8 (C-3a), 148.4 (C-1), 138.8 (C-1'''), 138.3 (C-8), 135.9 (C-1'), 130.1 (C-4'), 129.2 (C-10a), 129.1 (C-5'''), 129.0 (C-2', C-6'), 128.2 (C-3', C-5'), 127.8 (C-6a), 125.1 (C-9), 123.7 (C-7), 123.1 (C-10), 120.8 (C-6'''), 114.1 (C-2'''), 112.4 (C-4'''), 56.8 (C-1''), 54.8 (OCH₃), 38.4 (CH₃CH₂-Rotamer), 33.9 (CH₃CH₂-Rotamer), 15.6 (CH₃CH₂-Rotamer), 13.8 (CH₃CH₂-Rotamer), 11.9 (1-CH₃).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3427 s, 3056 w, 2925 m, 2245 w, 2123 w, 1719 w, 1603 m, 1586 m, 1520 s, 1435 m, 1326 s, 1263 s, 1156 w, 1027 m, 1004 m, 778 w, 694 m, 596 w.

MS (ESI+):

m/z = 520 [M+Na]⁺, 498 [M+H]⁺.

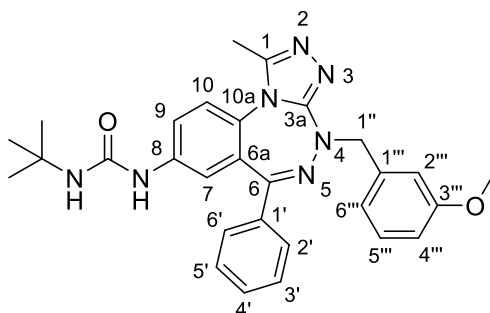
HR-MS (ESI+):

m/z = 498.2071 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₇H₂₈N₇OS⁺ 498.2076).

HPLC-Reinheit:

t_r (254 nm): 1.963 min, 94 %.

1-(*tert*-Butyl)-3-(4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-8-yl)harnstoff (21e)



$C_{29}H_{31}N_7O_2$

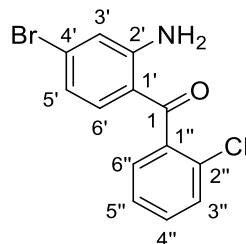
$M = 509.61 \text{ g/mol}$

75 mg (0.18 mmol) 8-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**2**) werden in 1.0 mL trockenem DMSO gelöst und mit 8 mg (0.2 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch 10 min gerührt und dann 63 μ L (0.55 mmol) *tert*-Butylisothiocyanat zugetropft. Daraufhin wird die Suspension 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in gesättigte Kochsalzlösung gegeben. Das Gemisch wird dreimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden nacheinander mit Wasser sowie gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 38 mg (0.074 mmol, 40 %) **21e** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 142.1 - 143.0 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.11 (s, 1H, 8-NH), 7.93 (dd, $^3J = 8.9 \text{ Hz}$, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 9-H), 7.46 - 7.43 (m, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.42 - 7.37 (m, 1H, 4'-H), 7.36 - 7.31 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.22 - 7.19 (m, 2H, 10-H, 5'''-H), 7.06 (d, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 6.96 (ddd, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 0.9 Hz, 1H, 6'''-H), 6.93 (dd, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 1.2 Hz, 1H, 2'''-H), 6.78 (ddd, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 0.9 Hz, 1H, 4'''-H), 5.60 (s, 1H, *t*Bu-NH), 5.04 (d, $^2J = 14.0 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 4.82 (d, $^2J = 14.0 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 3.72 (s, 3H, OCH_3), 2.45 (s, 3H, 1- CH_3), 1.31 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂):	δ (ppm) = 162.9 (C-6), 160.1 (C-3a), 160.0 (C-3), 154.9 (C=O), 148.8 (C-1), 140.3 (C-8), 139.5 (C-1'''), 137.1 (C-1'), 130.5 (C-4'), 129.7 (C-2', C-6'), 129.6 (C-5'''), 129.4 (C-6a), 128.6 (C-3', C-5'), 127.8 (C-10a), 123.4 (C-10), 121.5 (C-9, C-6'''), 120.1 (C-7), 114.7 (C-2'''), 113.1 (C-4'''), 58.0 (C-1''), 55.5 (OCH ₃), 50.8 (C(CH ₃) ₃), 29.4 (C(CH ₃) ₃), 12.6 (1-CH ₃).
IR (KBr):	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3365 m, 3059 w, 2959 m, 2924 m, 2854 w, 1704 m, 1604 w, 1587 w, 1535 s, 1518 s, 1491 m, 1454 m, 1434 m, 1390 w, 1324 w, 1264 m, 1204 m, 1030 m, 776 w, 693 m.
MS (ESI+):	m/z = 532 [M+Na] ⁺ , 510 [M+H] ⁺ , 411.
HR-MS (ESI+):	m/z = 510.2611 [M+H] ⁺ (berechnet für C ₂₉ H ₃₂ N ₇ O ₂ ⁺ 510.2617).
HPLC-Reinheit:	t _r (254 nm): 2.385 min, 96 %.
DC:	R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5) = 0.16

(2-Amino-4-bromophenyl)(2-chlorophenyl)methanon (26)C₁₃H₉BrClNO

M = 310.58 g/mol

Eine Lösung aus 2.2 mL (20 mmol) 3-Bromanilin (**22**) in 30 mL Dichlormethan wird zu einer auf -30 °C gekühlten Lösung aus 3.9 mL (30 mmol) Dichlorphenylboran (**24**) in 30 mL Dichlormethan zugetropft. Anschließend werden 7.0 mL (51 mmol) Triethylamin in 15 mL Dichlormethan zugetropft. Das Gemisch wird 30 min bei -30 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Arylbromids, welche durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen wird, werden 2.31 mL (20.3 mmol) 2-Chlorbenzaldehyd (**23**) in 45 mL Dichlormethan zugefügt. Die Kühlung wird entfernt und das Gemisch weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 200 mL kaltes Wasser gefolgt von 250 mL gesättigter Kochsalzlösung zugegeben. Die organische Phase wird separiert und die wässrige Phase zweimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das entstandene Zwischenprodukt wird mit 30 mL Diethylether und 60 mL 2 M Natronlauge versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wird dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mit 90 mL Dichlormethan und 8.5 g (97 mmol) Braunstein versetzt. Die entstandene Suspension wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert, eingeeengt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (100 % Ethylacetat) aufgereinigt. Es werden 3.14 g (10.1 mmol 50 %) **26** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 111.5 - 112.5 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.45 (ddd, ³J = 7.9 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, ⁵J = 0.5 Hz, 1H, 3''-H), 7.41 (ddd, ³J = 7.9 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, 4''-H), 7.36 (ddd, ³J = 7.3 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, 5''-H), 7.30 (ddd, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, ⁵J = 0.5 Hz, 1H, 6''-H), 7.01 (d,

$^3J = 8.6$ Hz, 1H, 6'-H), 6.91 (d, $^4J = 1.9$ Hz, 1H, 3'-H), 6.66 (dd, $^3J = 8.6$ Hz, $^4J = 1.9$ Hz, 1H, 5'-H), 6.50 (s, 2H, NH₂).

¹³C-NMR
(125 MHz, CDCl₃):

δ (ppm) = 196.8 (C=O), 151.9 (C-2'), 139.3 (C-1'), 135.9 (C-6'), 130.7 (C-2'), 130.6 (C-4''), 130.3 (C-4'), 129.9 (C-3''), 128.4 (C-6''), 126.7 (C-5''), 119.4 (C-3'), 119.2 (C-5'), 116.3 (C-1').

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3453 m, 3339 m, 1626 s, 1606 s, 1577 m, 1528 m, 1475 w, 1350 w, 1313 m, 1260 w, 1240 s, 1168 w, 1142 w, 1053 m, 932 s, 854 m, 806 w, 758 m, 739 m, 718 w, 690 w, 647 m.

MS (ESI+):

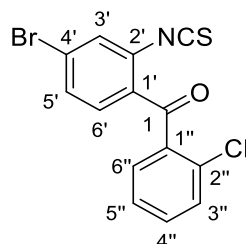
$m/z = 314, 312, 310$ [M+H]⁺, 298, 294, 296.

HR-MS (ESI+):

$m/z = 309.9626$ [M+H]⁺ (berechnet für C₁₃H₁₀BrClNO⁺ 309.9634).

HPLC-Reinheit:

t_r (254 nm): 1.547 min, > 99 %.

(4-Brom-2-isothiocyanatophenyl)(2-chlorphenyl)methanon (27)C₁₄H₇BrClNOS

M = 352.63 g/mol

Nach AAV4 wird eine Lösung von 3.11 g (10.0 mmol) (2-Amino-4-bromphenyl)(2-chlorphenyl)methanon (**26**) in 20 mL Dichlormethan zu einer Suspension aus 500 mL Wasser, 1.50 g (15.0 mmol) Calciumcarbonat und 1.70 mL (22.0 mmol) Thiophosgen gegeben. Nach 1 h Rühren bei 0 °C gefolgt von 4 h bei Raumtemperatur wird die Lösung wie in AAV4 beschrieben aufgearbeitet. Es werden 3.30 g (9.35 mmol, 94 %) **27** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 64.0 - 65.0 °C

¹H-NMR δ (ppm) = 7.51 - 7.44 (m, 6H), 7.41 (ddd, ³J = 7.4 Hz, 4.9 Hz, ⁴J = 3.8 Hz, 1H).
(500 MHz, CDCl₃):

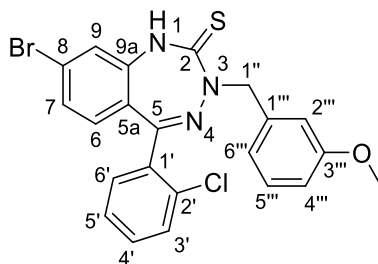
¹³C-NMR δ (ppm) = 192.4 (C=O), 138.0 (C_{qar}), 137.9 (C_{qar}), 132.5 (C_{Har}), 132.3 (C_{Har}), 132.1 (C_{qar}), 131.8 (C_{qar}), 131.5 (C_{qar}), 131.0 (C_{Har}), 130.4 (C_{Har}), 130.3 (C_{Har}), 130.1 (C_{Har}), 127.5 (C_{qar}), 127.3 (C_{Har}).
(100 MHz, CD₂Cl₂):

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3072 w, 2202 w, 2109 s, 1670 s, 1578 s, 1551 m, 1467 m, 1433 m, 1390 m, 1295 m, 1269 m, 1242 m, 1160 w, 1128 w, 1075 m, 1055 m, 957 w, 926 s, 868 m, 843 m, 757 s, 675 w, 644 w.

MS (ESI+): m/z = 356, 354, 352 [M+H]⁺, 400, 358, 356.

HR-MS (ESI+): m/z = 351.9201 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₄H₈BrClNOS⁺ 351.9199).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.695 min, 96 %.

8-Brom-5-(2-chlorphenyl)-3-(3-methoxybenzyl)-1,3-dihydro-2H-benzo[e][1,2,4]triazepin-2-thion (29)C₂₂H₁₇BrClN₃OS

M = 486.81 g/mol

0.83 g (4.4 mmol) *m*-Methoxybenzylhydrazin-Hydrochlorid (**5**) und 841 μ L (4.82 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin werden in 11 mL Methanol, wie im Detail in AAV2 beschrieben, gelöst. Eine Lösung von 1.42 g (4.02 mmol) (4-Brom-2-isothiocyanatophenyl)(2-chlorphenyl) methanon (**27**) in 11 mL Tetrahydrofuran wird zu dieser Lösung getropft. AAV2 wird weiter befolgt. Es werden 1.43 g (2.95 mmol, 73 %) **29** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 234.1 - 236.0°C

¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.59 (s, 1H, 1-H), 7.32 - 7.28 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.18 (ddd, ³J = 7.6 Hz, 6.0 Hz, ⁴J = 2.7 Hz, 1H, 5'-H), 7.14 (dd, ³J = 8.2 Hz, 7.5 Hz, 1H, 5'''-H), 7.08 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, 7-H), 7.06 (d, ⁴J = 1.7 Hz, 1H, 9-H), 6.83 (ddd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, 1H, 6'-H), 6.81 (ddd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 0.9 Hz, 1H, 6'''-H), 6.76 (dd, ⁴J = 2.6 Hz, 1.6 Hz, 1H, 2'''-H), 6.73 (ddd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 2.6 Hz, 0.9 Hz, 1H, 4'''-H), 6.50 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, 6-H), 5.21 (s, 2H, 1''-H), 3.62 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 192.7 (C=S), 166.7 (C-5), 160.3 (C-3'''), 144.5 (C-9a), 138.8 (C-1'''), 135.7 (C-1'), 133.7 (C-2'), 131.9 (C-4', C-6'), 131.0 (C-6), 130.6 (C-3'), 129.9 (C-5'''), 128.2 (C-7), 127.5 (C-5'), 127.2 (C-8), 126.1 (C-5a), 123.6 (C-9), 121.1 (C-6'''), 114.0 (C-2'''), 113.6 (C-4'''), 60.3 (C-1''), 55.6 (OCH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3209 w, 3069 w, 3011 w, 2958 w, 2832 w, 1594 s, 1519 m, 1473 m, 1464 m, 1434 w, 1390 w, 1369 m, 1325 m,

1266 s, 1244 m, 1184 m, 1164 s, 1081 w, 1041 m, 994 m, 962 w, 945 w, 868 w, 816 w, 785 w, 756 w, 745 m, 693 w.

MS (ESI+):

$m/z = 490, 488, 486 [M+H]^+$.

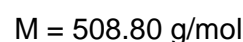
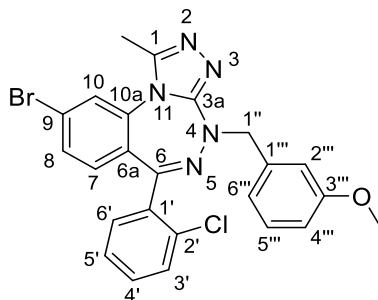
HR-MS (ESI+):

$m/z = 486.0040 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{22}H_{18}BrClN_3OS^+$ 486.0042).

HPLC-Reinheit:

t_r (254 nm): 2.421 min, 98 %.

**9-Brom-6-(2-chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo-
[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (30)**



1.50 g (3.09 mmol) 8-Brom-5-(2-chlorphenyl)-3-(3-methoxybenzyl)-1,3-dihydro-2*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazepin-2-thion (**29**) werden in 18 mL Tetrahydrofuran gelöst. Nach Zugabe von 750 µL (15.4 mmol) Hydrazin-Hydrat wird die Lösung 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat gelöst. Anschließend wird die organische Phase dreimal mit Wasser sowie einmal mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Zwischenprodukt wird in 10 mL Toluol gelöst und mit 740 µL (4.02 mmol) Triethylorthoacetat sowie 118 mg (0.620 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt. Die Lösung wird 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 98.5:2.5) aufgereinigt. Es werden 1.18 g (2.32 mmol, 75 %) **30** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 229.4 - 231.1 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.51 (d, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, 10-H), 7.43 (dd, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 1.8 Hz, 1H, 8-H), 7.41 - 7.29 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.25 - 7.20 (m, 1H, 5'''-H), 6.98 (ddd, ³*J* = 7.4 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, 6'''-H), 6.94 (dd, ⁴*J* = 2.6 Hz, 1.5 Hz, 1H, 2'''-H), 6.86 (dd, ³*J* = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 6.80 (ddd, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.6 Hz, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 5.22 - 4.73 (m, 2H, 1''-H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 2.55 (s, 3H, 1-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 160.5 (C-6), 160.3 (C-3a), 160.0 (C-3'''), 148.5 (C-1), 139.2 (C-1'''), 135.8 (C-1'), 135.5 (C-10a), 133.2 (C-2'), 132.0 (C-4'), 131.5 (C-6'), 131.1 (C-7), 130.8 (C-8), 130.5 (C-

3'), 129.6 (C-5'''), 129.1 (C-6a), 127.5 (C-5'), 125.8 (C-10), 125.6 (C-9), 121.5 (C-6'''), 114.7 (C-2'''), 113.1 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH₃), 12.8 (1-CH₃).

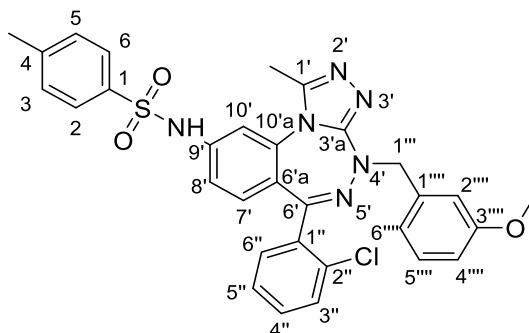
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3058 w, 3022 w, 2970 w, 2830 w, 1735 w, 1592 s, 1535 s, 1522 m, 1489 s, 1432 s, 1376 w, 1349 w, 1321 m, 1288 w, 1265 s, 1151 w, 1139 m, 1081 w, 1046 s, 965 w, 879 m, 827 m, 772 m, 760 m, 746 m, 691 w.

MS (ESI+): m/z = 512, 510, 508 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 508.0508 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₅H₁₉BrClN₅O⁺ 508.0540).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.578 min, > 99 %.

DC: R_f (100 % Ethylacetat) = 0.33


$$M = 599.11 \text{ g/mol}$$

Schmelzpunkt: 130.8 °C

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 161.0 (C-6'), 160.1 (C-3'a), 160.0 (C-3'''), 149.1 (C-1'), 145.1 (C-4), 141.0 (C-9'), 139.2 (C-1'''), 136.5 (C-1), 136.1 (C-1''), 135.1 (C-10'a), 133.4 (C-2''), 132.0 (C-6''), 131.4 (C-4''), 131.1 (C-7'), 130.5 (C-3''), 130.9 (C-3, C-5), 129.6 (C-5'''), 127.6 (C-2, C-6), 127.5 (C-5''), 125.6 (C-6'a), 121.5 (C-6'''),

118.8 (C-8'), 114.7 (C-2'''), 114.0 (C-10'), 113.2 (C-4'''), 57.9 (C-1'''), 55.5 (OCH₃), 21.7 (4-CH₃), 12.7 (1'-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3441 m, 3057 w, 2922 w, 2834 w, 1614 s, 1598 m, 1528 m, 1491 m, 1434 m, 1324 m, 1265 m, 1162 s, 1090 m, 1038 m, 941 m, 813 w, 775 m, 750 m, 691 m, 659 m, 564 m, 545 m.

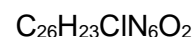
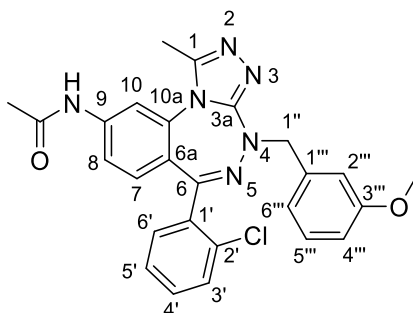
MS (ESI+): m/z = 601, 599 [M+H]⁺, 432, 430.

HR-MS (ESI+): m/z = 599.1623 [M+H]⁺ (berechnet für C₃₁H₂₈ClN₆O₃S⁺ 599.1632).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.146 min, > 99 %.

DC: R_f (100 % Ethylacetat) = 0.35

***N*-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)acetamid (31b)**



$$M = 486.96 \text{ g/mol}$$

Nach AAV5 werden 7 mg (0.1 mmol) Acetamid zu 2 mg (2 mol %) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 4 mg (6 mol %) Xantphos, 51 mg (0.10 mmol) 9-Brom-6-(2-chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**30**) und 46 mg (0.14 mmol) Cäsiumcarbonat zugegeben. Anschließend werden 0.5 mL 1,4-Dioxan zugefügt und die Suspension 3 h bei 100 °C gerührt. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (100 % Dichlormethan bis Dichlormethan/Methanol 97:3) werden 32 mg (0.066 mmol, 66 %) **31b** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 292.0 °C

¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.92 (s, 1H, NH), 8.08 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, 10-H), 7.39 - 7.27 (m, 5H, 8-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.18 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, 7.6 Hz, 1H, 5'''-H), 6.95 (d, ³*J* = 7.6 Hz, 1H, 6'''-H), 6.93 - 6.92 (m, 1H, 2'''-H), 6.88 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 6.76 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, 4'''-H), 4.94 (bs, 2H, 1''-H), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 2.56 (s, 3H, 1-CH₃), 2.18 (s, 3H, CH₃CO).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 169.6 (C=O), 161.2 (C-6), 160.1 (C-3a), 160.0 (C-3'''), 149.2 (C-1), 142.1 (C-9), 139.4 (C-1'''), 136.3 (C-1'), 135.0 (C-10a), 133.4 (C-2'), 132.0 (C-6'), 131.3 (C-4'), 130.6 (C-7), 130.4 (C-3'), 129.6 (C-5'''), 127.4 (C-5'), 124.6 (C-6a), 121.4 (C-6'''), 117.6 (C-8), 114.6 (C-2'''), 113.4 (C-10), 113.1 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH₃), 24.9 (CH₃CO), 13.0 (1-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3254 w, 3185 w, 3105 w, 3056 w, 2923 w, 2830 w, 1691 m, 1606 s, 1587 s, 1538 s, 1522 s, 1492 m, 1456 m, 1432 m, 1406 m, 1354 m, 1336 w, 1315 w, 1258 s, 1156 w, 1055 w, 999 w, 962 w, 881 w, 833 w, 777 m, 752 w, 737 w, 692 w.

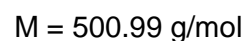
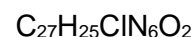
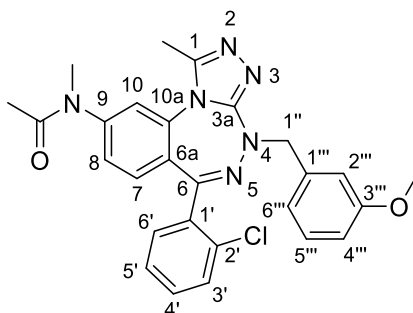
MS (ESI+): m/z = 511, 509 [M+Na]⁺, 489, 487 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 487.1640 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₆H₂₄ClN₆O₂⁺ 487.1649).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.109 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.20

***N*-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)-*N*-methylacetamid (31c)**



Nach AAV5 werden 9 mg (0.1 mmol) *N*-Methylacetamid zu 2 mg (2 mol %) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 4 mg (6 mol %) Xantphos, 51 mg (0.10 mmol) 9-Brom-6-(2-chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**30**) und 46 mg (0.14 mmol) Cäsiumcarbonat zugegeben. Anschließend werden 0.5 mL 1,4-Dioxan zugefügt und die Suspension 24 h bei 100 °C gerührt. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (100 % Dichlormethan bis Dichlormethan/Methanol 97:3) werden 28 mg (0.056 mmol, 56 %) **31c** als brauner Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 122.5 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.44 - 7.26 (m, 5H, 10-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.24 (dd, ³*J* = 8.2 Hz, 7.6 Hz, 1H, 5'''-H), 7.14 (dd, ³*J* = 8.4 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H, 8-H), 7.01 (m, 2H, 7-H 6'''-H), 6.96 (s, 1H, 2'''-H), 6.81 (dd, ³*J* = 8.2 Hz, ⁴*J* = 2.2 Hz, 1H, 4'''-H), 4.98 (bs, 2H, 1''-H), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.32 (s, 3H, NCH₃), 2.55 (s, 3H, 1-CH₃), 2.04 (s, 3H, CH₃CO).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 170.1 (C=O), 160.5 (C-6), 160.2 (C-3'''), 160.0 (C-3a), 148.6 (C-1), 147.3 (C-9), 139.4 (C-1'''), 136.1 (C-1'), 135.2 (C-10a), 133.3 (C-2'), 131.9 (C-6'), 131.4 (C-4'), 131.0 (C-7), 130.5 (C-3'), 129.6 (C-5'''), 127.5 (C-5'), 125.1 (C-8), 121.6 (C-6'''), 121.1 (C-6a, C-10), 114.9 (C-2'''), 113.1 (C-4'''), 58.0 (C-1''), 55.5 (OCH₃), 37.6 (NCH₃), 23.0 (CH₃CO), 12.9 (1-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3061 w, 3003 m, 2934 w, 2836 w, 1667 s, 1607 s, 1573 w, 1537 m, 1524 m, 1500 m, 1455 m, 1435 m, 1377 m, 1350 m, 1266 m, 1156 m, 1138 m, 1002 w, 966 w, 900 w, 880 w, 838 w, 752 s, 692 w, 664 w.

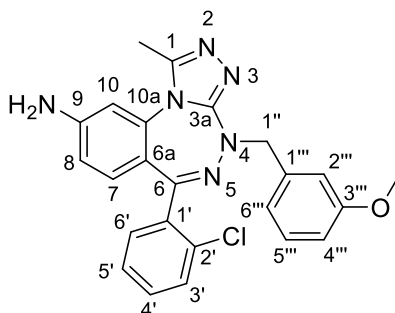
MS (ESI+): m/z = 525, 523 [M+Na]⁺, 503, 501 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 501.1795 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₇H₂₆ClN₆O₂⁺ 501.1806).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 0.900 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.32

6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-amin (32**)**



$C_{24}H_{21}ClN_6O$

$M = 444.92 \text{ g/mol}$

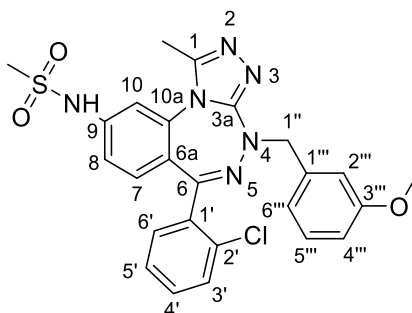
Ein Schlenk Kolben wird unter Stickstoffatmosphäre mit 46 mg (0.73 mmol) Kupferpulver und 185 mg (0.364 mmol) 9-Brom-6-(2-chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**30**) befüllt. Dann werden 0.7 mL Dimethylacetamid, gefolgt von 55 μL (0.91 mmol) 2-Aminoethanol und 97 μL (0.73 mmol) Trimethylsilylazid zugesetzt. Die Suspension wird 1.5 h bei 95 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Arylbromids (DC-Kontrolle) wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur gekühlt, mit 20 mL Ethylacetat versetzt, filtriert und anschließend nacheinander mit Wasser und konzentrierter wässriger Ammoniaklösung gewaschen. Die wässrigen Phasen werden dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (100 % Ethylacetat bis Ethylacetat/Methanol 90:10) aufgereinigt. Es werden 139 mg (0.312 mmol, 86 %) **32** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 237.2°C

$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.36 - 7.24 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.22 (dd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 7.5 Hz, 1H, 5'''-H), 6.99 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 6'''-H), 6.96 - 6.95 (m, 1H, 2'''-H), 6.79 (dd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J = 2.6 \text{ Hz}$, 1H, 4'''-H), 6.72 (d, $^3J = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 6.57 (d, $^4J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H, 10-H), 6.51 (dd, $^3J = 8.5 \text{ Hz}$, $^4J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 5.06 (d, $^2J = 15.1 \text{ Hz}$, 1H, 1''-CH₂), 4.82 (d, $^2J = 15.1 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 4.40 (s, 2H, NH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.53 (s, 3H, 1-CH₃).

^{13}C-NMR (125 MHz, CD_2Cl_2):	δ (ppm) = 161.5 (C-6), 160.0 (C-3a, C-3'''), 150.2 (C-1), 148.7 (C-9), 139.7 (C-1'''), 136.7 (C-1'), 135.8 (C-10a), 133.5 (C-2'), 131.9 (C-6'), 131.5 (C-7), 130.9 (C-4'), 130.3 (C-3'), 129.5 (C-5'''), 127.2 (C-5'), 121.4 (C-6'''), 119.3 (C-6a), 114.6 (C-2'''), 113.1 (C-8), 113.0 (C-4'''), 107.7 (C-10), 57.8 (C-1''), 55.5 (OCH_3), 13.1 (1-CH_3).
IR (KBr):	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3451 m, 3178 m, 2924 w, 1642 m, 1614 s, 1587 m, 1540 m, 1524 s, 1505 w, 1490 w, 1467 w, 1419 w, 1337 m, 1268 m, 1171 w, 1152 w, 1044 m, 872 w, 782 w, 754 w, 747 w, 730 w, 697 w, 646 w.
MS (ESI+):	m/z = 467 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 447, 445 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
HR-MS (ESI+):	m/z = 445.1535 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{ClN}_6\text{O}^+$ 445.1544).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 1.117 min, > 99 %.
DC:	R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5) = 0.22

***N*-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)methansulfonamid (33a)**



$C_{25}H_{23}ClN_6O_3S$

$M = 523.01 \text{ g/mol}$

50 mg (0.11 mmol) 9-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**32**) und 0.5 mg (0.004 mmol) 4-DMAP werden in trockenem Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 14 μL (0.17 mmol) Methansulfonylchlorid wird die Lösung bei Raumtemperatur 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 56 mg (0.11 mmol, 96 %) **33a** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 169.6 °C

$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 10.33 (s, 1H, NH), 7.55 (d, $^4J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, 10-H), 7.40 - 7.26 (m, 5H, 8-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.15 (dd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 7.9 Hz, 1H, 5'''-H), 6.98 - 6.90 (m, 3H, 7-H, 2'''-H, 6'''-H), 6.74 (dd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J = 2.0 \text{ Hz}$, 1H, 4'''-H), 5.03 (bs, 1H, 1''-H), 4.89 (bs, 1H, 1''-CH₂), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.09 (s, 3H, SO₂-CH₃), 2.61 (s, 3H, 1-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(125 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 161.3 (C-6), 160.0 (C-3a, C-3'''), 149.5 (C-1), 142.1 (C-9), 139.1 (C-1'''), 136.0 (C-1'), 135.2 (C-10a), 133.4 (C-2'), 132.0 (C-6'), 131.4 (C-4'), 131.3 (C-7), 130.5 (C-3'), 129.6 (C-5'''), 127.5 (C-5'), 124.8 (C-6a), 121.4 (C-6'''), 117.5 (C-8), 114.7 (C-2'''), 113.1 (C-10), 113.0 (C-4'''), 57.8 (C-1'), 55.5 (OCH₃), 40.6 (SO₂-CH₃), 12.8 (1-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3442 w, 3056 w, 2926 w, 2834 w, 1615 s, 1528 s, 1491 m, 1435 m, 1399 w, 1326 s, 1265 m, 1155 s, 1039 m, 964 m, 876 w, 835 w, 759 m, 751 m, 691 w, 517 m.

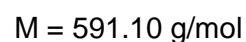
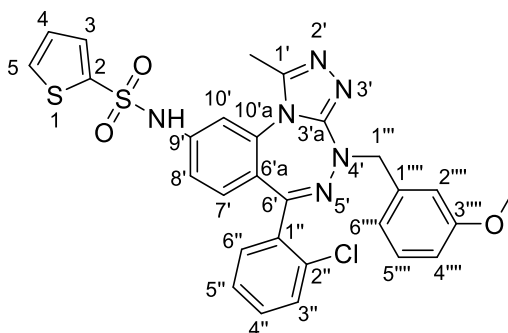
MS (ESI+): m/z = 525, 523 [M+H]⁺, 447, 445.

HR-MS (ESI+): m/z = 523.1310 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₅H₂₄ClN₆O₃S⁺ 523.1319).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 0.949 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.23

***N*-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)thiophen-2-sulfonamid (33b)**



50 mg (0.11 mmol) 9-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**32**) und 0.5 mg (0.004 mmol) 4-DMAP werden in trockenem Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 32 mg (0.17 mmol) 2-Thiophensulfonylchlorid wird die Lösung bei Raumtemperatur 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 60 mg (0.10 mmol, 90 %) **33b** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 223.0 °C

¹H-NMR
(500 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) = 11.19 (s, 1H, NH), 7.98 (dd, ³*J* = 5.0 Hz, ⁴*J* = 1.4 Hz, 1H, 5-H), 7.71 (dd, ⁴*J* = 3.8 Hz, 1.4 Hz, 1H, 3-H), 7.50 - 7.40 (m, 3H, 3''-H, 4''-H, 5''-H), 7.36 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, 10'-H), 7.31 (dd, ³*J* = 7.2 Hz, ⁴*J* = 1.3 Hz, 1H, 6''-H), 7.23 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, 7.8 Hz, 1H, 5'''-H), 7.18 - 7.14 (m, 2H, 4-H, 8'-H), 6.92 - 6.89 (m, 3H, 7'-H, 2'''-H, 6'''-H), 6.83 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 2.4 Hz, 1H, 4'''-H), 4.82 (bs, 2H, 1'''-H), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 2.42 (s, 3H, 1'-CH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) = 160.3 (C-6'), 159.0 (C-3'''), 158.5 (C-3'a), 148.1 (C-1'), 140.6 (C-9'), 139.2 (C-2), 138.5 (C-1'''), 135.2 (C-1''), 134.1 (C-5), 134.0 (C-10'a), 133.1 (C-3), 131.8 (C-2''), 131.3 (C-4'', C-6''), 130.6 (C-7'), 129.8 (C-3''), 129.1 (C-5'''), 127.8 (C-4), 127.3 (C-5''), 123.9 (C-6'a), 120.7 (C-6'''), 117.6 (C-8'),

114.0 (C-2'''), 112.9 (C-10'), 112.5 (C-4'''), 56.6 (C-1'''), 54.8 (OCH₃), 12.1 (1'-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3434 w, 3096 w, 3085 w, 3014 w, 2915 w, 2836 w, 2730 w, 1614 s, 1603 s, 1536 s, 1525 s, 1494 m, 1466 w, 1437 m, 1401 m, 1344 s, 1329 m, 1267 m, 1225 w, 1162 s, 1093 w, 1038 m, 1015 w, 967 w, 944 w, 898 w, 879 w, 856 w, 834 w, 789 m, 761 m, 732 m, 693 w, 591 m.

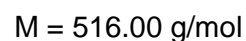
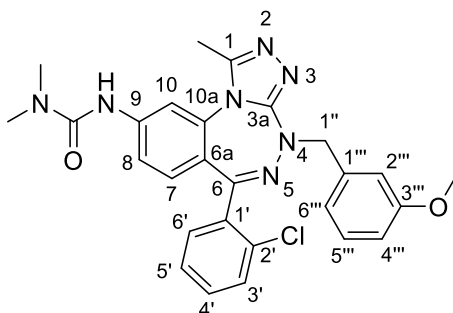
MS (ESI+): m/z = 615, 613 [M+Na]⁺, 593, 591 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 591.1031 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₈H₂₄ClN₆O₃S₂⁺ 591.1040).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 0.949 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.23

3-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)-1,1-dimethylharnstoff (33c)



50 mg (0.11 mmol) 9-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**32**) und 0.5 mg (0.004 mmol) 4-DMAP werden in 0.5 mL trockenem Pyridin gelöst. Anschließend werden 31 μL (0.34 mmol) Dimethylcarbamoylchlorid zugesetzt. Das Gemisch wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf gesättigte Kochsalzlösung gegeben. Das Gemisch wird dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das entstandene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 18 mg (0.037 mmol, 33 %) **33c** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 144.3 °C

$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.96 (d, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H, 10-H), 7.38 - 7.28 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.27 (dd, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 7.20 (dd, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 7.8 Hz, 1H, 5'''-H), 7.02 (dd, $^3J = 8.6 \text{ Hz}$, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 6.97 (d, $^3J = 7.8 \text{ Hz}$, 1H, 6'''-H), 6.95 (s, 1H, NH), 6.93 (s, 1H, 2'''-H), 6.83 (d, $^3J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 6.78 (dd, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, $^4J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H, 4'''-H), 4.93 (bs, 2H, 1''-H), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.01 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.56 (s, 3H, 1- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$
(125 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 161.2 (C-6), 160.1 (C-3a), 160.0 (C-3'''), 155.2 (C=O), 149.1 (C-1), 143.3 (C-9), 139.6 (C-1'''), 136.5 (C-1'), 135.1 (C-10a), 133.4 (C-2'), 132.0 (C-6'), 131.1 (C-4'), 130.4

(C-3'), 130.3 (C-7), 129.5 (C-5'''), 127.4 (C-5'), 123.4 (C-6a), 121.5 (C-6'''), 117.1 (C-8), 114.6 (C-2'''), 113.1 (C-4'''), 113.0 (C-10), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH₃), 36.8 (N(CH₃)₂), 13.1 (1-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3425 m, 3057 w, 2933 w, 2834 w, 1675 s, 1614 m, 1596 s, 1534 s, 1518 s, 1437 m, 1405 m, 1325 m, 1265 m, 1229 m, 1168 m, 1038 m, 965 w, 879 w, 831 w, 776 w, 749 m, 691 w.

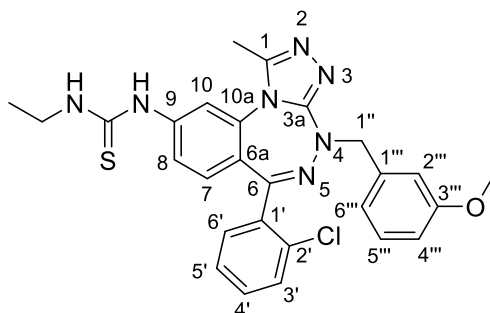
MS (ESI+): m/z = 518, 516 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 516.1904 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₇H₂₇ClN₇O₂⁺ 516.1915).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.127 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.21

1-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)-3-ethylthioharstoff (33d)



$C_{27}H_{26}ClN_7OS$

$M = 532.06 \text{ g/mol}$

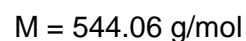
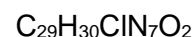
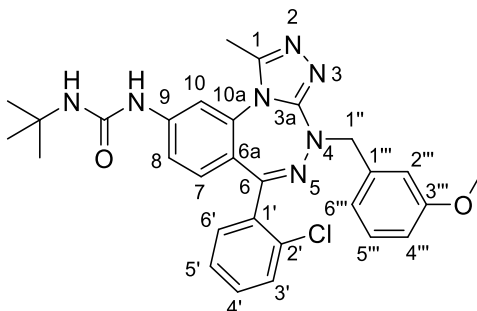
70 mg (0.16 mmol) 9-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**32**) werden in 0.5 mL trockenem Dimethylsulfoxid gelöst und mit 7 mg (0.2 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Dann werden 52 μL (0.56 mmol) Ethylisothiocyanat zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird 5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf eine gesättigte Kochsalzlösung gegeben. Das Gemisch wird dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das entstandene Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 23 mg (0.042 mmol, 27 %) **33d** als hellbrauner Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 188.9 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 9.42 (s, 1H, Et-NH), 8.35 (d, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H, 10-H), 7.69 (s, 1H, 8-NH), 7.40 - 7.25 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.23 (dd, $^3J = 8.6 \text{ Hz}$, $^4J = 2.1 \text{ Hz}$, 1H, 8-H), 7.18 (dd, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, 7.5 Hz, 1H, 5'''-H), 6.93 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 6'''-H), 6.90 (s, 1H, 2'''-H), 6.89 (d, $^3J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 6.77 (ddd, $^3J = 8.3 \text{ Hz}$, $^4J = 2.7 \text{ Hz}$, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 4.93 (bs, 2H, 1''-H), 3.70 (s, 3H, OCH_3), 3.68 - 3.61 (m, 1.6H, CH_3CH_2 -Rotamer), 3.19 - 3.12 (m, 0.4H, CH_3CH_2 -Rotamer), 2.63 (s, 3H, 1- CH_3), 1.26 (t, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 2.4H, CH_3CH_2 -Rotamer), 1.10 (t, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 0.6H, CH_3CH_2 -Rotamer).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂):	δ (ppm) = 180.7 (C=S), 161.3 (C-6), 160.0 (C-3'''), 159.9 (C-3a), 149.5 (C-1), 143.2 (C-9), 139.1 (C-1'''), 136.1 (C-1'), 134.3 (C-10a), 133.4 (C-2'), 131.9 (C-6'), 131.3 (C-4'), 130.5 (C-7, C-3'), 129.6 (C-5'''), 127.4 (C-5'), 124.7 (C-6a), 121.4 (C-6'''), 120.2 (C-8), 116.0 (C-10), 114.7 (C-2'''), 113.1 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH ₃), 40.0 (CH ₃ CH ₂ -Rotamer), 35.8 (CH ₃ CH ₂ -Rotamer), 15.7 (CH ₃ CH ₂ -Rotamer), 14.3 (CH ₃ CH ₂ -Rotamer), 13.3 (1-CH ₃).
IR (KBr):	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3423 w, 3269 w, 3056 w, 2968 w, 2927 w, 2834 w, 1615 s, 1537 s, 1492 m, 1436 m, 1413 w, 1356 m, 1329 m, 1265 s, 1155 m, 1037 m, 965 w, 875 w, 826 w, 776 w, 749 m, 689 w.
MS (ESI+):	m/z = 554 [M+Na] ⁺ , 534, 532 [M+H] ⁺ .
HR-MS (ESI+):	m/z = 532.1676 [M+H] ⁺ (berechnet für C ₂₇ H ₂₇ ClN ₇ OS ⁺ 532.1686).
HPLC-Reinheit:	t _r (254 nm): 1.176 min, 97 %.
DC:	R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5) = 0.22

1-(*tert*-Butyl)-3-(6-(2-chlorophenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-9-yl)harnstoff (33e)



50 mg (0.11 mmol) 9-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**32**) werden in 0.5 mL trockenem Dimethylsulfoxid gelöst und mit 5 mg (0.12 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Anschließend werden 39 µL (0.34 mmol) *tert*-Butylisocyanat zugetropft. Die Lösung wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) aufgereinigt. Es werden 60 mg (0.11 mmol, 99 %) **33e** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 275.2 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.72 (s, 1H, 9-NH), 7.91 (d, ⁴*J* = 1.9 Hz, 1H, 10-H), 7.37 - 7.23 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.20 (dd, ³*J* = 8.7 Hz, ⁴*J* = 1.9 Hz, 1H, 8-H), 7.18 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, 7.7 Hz, 1H, 5'''-H), 6.93 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1H, 6'''-H), 6.91 - 6.90 (m, 1H, 2'''-H), 6.80 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 6.75 (dd, ³*J* = 8.1 Hz, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, 4'''-H), 5.91 (s, 1H, *t*Bu-NH), 4.93 (bs, 2H, 1''-H), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 2.62 (s, 3H, 1-CH₃), 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃)

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 162.0 (C-6), 160.0 (C-3'''), 159.8 (C-3a), 154.5 (C=O), 149.5 (C-1), 144.7 (C-9), 139.1 (C-1'''), 136.2 (C-1'), 134.4 (C-10a), 133.5 (C-2'), 131.9 (C-6'), 131.2 (C-4'), 130.7 (C-7), 130.4 (C-3'), 129.6 (C-5'''), 127.4 (C-5'), 122.0 (C-6a), 121.3 (C-6'''), 116.7 (C-8), 114.5 (C-2'''), 113.2 (C-4'''), 111.7 (C-10), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH₃), 51.0 (C(CH₃)₃), 29.3 (C(CH₃)₃), 13.1 (1-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3384 m, 2994 w, 2996 w, 2833 w, 1703 s, 1617 m, 1595 s, 1538 s, 1542 m, 1390 w, 1356 m, 1339 m, 1290 w, 1261 s, 1190 s, 1157 m, 1057 w, 1038 m, 875 w, 831 w, 776 m, 767 m, 748 w, 690 w.

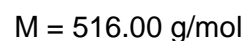
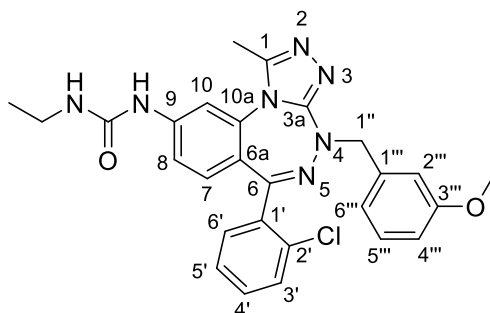
MS (ESI+): m/z = 566 [M+Na]⁺, 546, 544 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 544.2220 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₉H₃₁ClN₇O₂⁺ 544.2228).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.275 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.30

1-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)-3-ethylharnstoff (33f)



50 mg (0.11 mmol) 9-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**32**) werden in 0.5 mL trockenem Dimethylsulfoxid gelöst und mit 5 mg (0.1 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Dann werden 10 µL (0.12 mmol) Ethylisocyanat zugetropft. Die Suspension wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in gesättigte Kochsalzlösung gegeben. Das Gemisch wird dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) wird das Rohprodukt aufgereinigt und 21 mg (0.040 mmol, 35 %) **33f** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 287.9 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.73 (s, 1H, 9-NH), 7.95 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, 10-H), 7.40 - 7.21 (m, 5H, 8-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.18 (dd, ³*J* = 8.3 Hz, 7.4 Hz, 1H, 5'''-H), 6.94 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, 6'''-H), 6.92 - 6.91 (m, 1H, 2'''-H), 6.82 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 6.76 (ddd, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.7 Hz, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 6.24 (t, ³*J* = 5.5 Hz, 1H, Et-NH), 4.94 (bs, 2H, 1''-H), 3.69 (s, 3H, OCH₃), 3.28 (qd, ³*J* = 7.2 Hz, 5.5 Hz, 2H, CH₂-CH₃), 2.59 (s, 3H, 1-CH₃), 1.16 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 161.8 (C-6), 160.1 (C-3'''), 160.0 (C-3a), 155.4 (C=O), 149.3 (C-1), 144.3 (C-9), 139.3 (C-1'''), 136.4 (C-1'), 134.8 (C-10a), 133.5 (C-2'), 132.0 (C-6'), 131.2 (C-4'), 130.7

(C-7), 130.4 (C-3'), 129.6 (C-5'''), 127.3 (C-5'), 122.5 (C-6a), 121.3 (C-6'''), 116.6 (C-8), 114.6 (C-2''), 113.2 (C-4'''), 111.9 (C-10), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH₃), 35.4 (CH₂-CH₃), 15.7 (CH₂-CH₃), 13.2 (1-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3335 w, 3054 w, 2969 w, 2972 w, 1690 s, 1595 s, 1531 s, 1492 m, 1437 m, 1407 w, 1335 w, 1264 m, 1228 s, 1150 w, 1039 m, 996, w, 966 w, 881 w, 835 w, 778 m, 759 m, 733 m, 690 w.

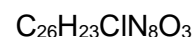
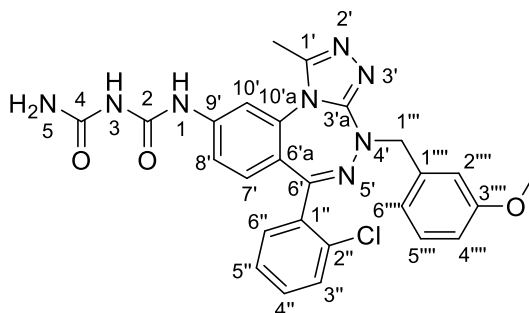
MS (ESI+): m/z = 540, 538 [M+Na]⁺, 518, 516 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 516.1906 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₇H₂₇ClN₇O₂⁺ 516.1915).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 0.886 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.21

1-((6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl))-biuret (33g)



M = 530.97 g/mol

50 mg (0.11 mmol) 9-Amino-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-6-phenyl-4*H*-benzo[*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**32**) werden in 2.0 mL trockenem Tetrahydrofuran und 0.1 mL Dimethylsulfoxid gelöst und anschließend mit 5 mg (0.1 mmol) einer 60 %igen Natriumhydrid-Dispersion in Mineralöl versetzt. Dann werden 150 µL (1.12 mmol) Trimethylsilylisocyanat zugetropft. Die Suspension wird 48 h auf 60 °C erwärmt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, 5.0 mL 4 M Salzsäure in 1,4-Dioxan zugegeben und 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert wird mittels 2 M Natronlauge auf 11 gebracht. Das Gemisch wird dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser, anschließend mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97:3) wird das Rohprodukt aufgereinigt und 23 mg (0.043 mmol, 38 %) **33g** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 169.4 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*D*₆): 10.47 (s, 1H, 1-NH), 9.08 (s, 1H, 3-NH), 7.94 (d, ⁴*J* = 2.1 Hz, 1H, 10'-H), 7.50 - 7.44 (m, 2H, 3''-H, 4''-H), 7.46 - 7.39 (m, 1H, 5''-H), 7.36 - 7.30 (m, 2H, 8'-H, 6''-H), 7.25 - 7.21 (dd, ³*J* = 8.3 Hz, 8.1 Hz, 1H, 5''''-H), 7.11 (s, 2H, 5-NH₂), 6.96 - 6.88 (m, 3H, 7'-H, 2''''-H, 6''''-H), 6.82 (ddd, ³*J* = 8.3 Hz, ⁴*J* = 2.3 Hz, 1.4 Hz, 1H, 4''''-H), 4.86 (s, 2H, 1'''-H), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 2.51 (s, 3H, 1'-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*D*₆): 160.4 (C-6'), 159.0 (C-3'''), 158.6 (C-3'a), 155.0 (C-4), 152.0 (C-2), 148.2 (C-1'), 141.3 (C-9'), 138.6 (C-1'''), 135.4 (C-1''),

133.9 (C-10'a), 131.8 (C-2''), 131.3 (C-6''), 131.2 (C-4''), 130.0 (C-7'), 129.8 (C-3''), 129.1 (C-5'''), 127.3 (C-5''), 122.8 (C-6'a), 120.6 (C-6'''), 117.5 (C-8'), 114.1 (C-2'''), 112.5 (C-4'''), 112.4 (C-10'), 56.7 (C-1'''), 54.8 (OCH₃), 12.2 (1'-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3401 m, 3058 w, 2925 w, 2854 w, 1702 s, 1587 s, 1542 s, 1491 m, 1437 m, 1406 w, 1330 m, 1266 w, 1199 s, 1149 m, 1039 w, 964 w, 879 w, 833 w, 774 m, 750 m, 731 w, 691 w.

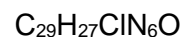
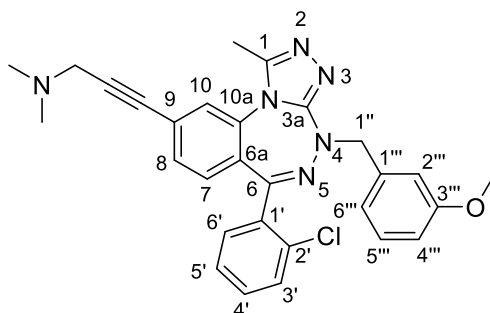
MS (ESI+): m/z = 555, 553 [M+Na]⁺, 533, 531 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 531.1651 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₆H₂₄ClN₈O₃⁺ 531.1660).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.083 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.10

3-(6-(2-Chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-9-yl)-*N,N*-dimethylprop-2-in-1-amin (34)



M = 511.03 g/mol

Ein Schlenk Kolben wird mit 4 mg (5 mol %) Pd(dppf)Cl₂, 4 mg (20 mol %) CuI und 51 mg (0.10 mmol) 9-Brom-6-(2-chlorphenyl)-4-(3-methoxybenzyl)-1-methyl-4*H*-benzo[e][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**30**) unter Stickstoffatmosphäre befüllt. 0.5 mL eines 1:1 Gemisches aus trockenem Tetrahydrofuran und Triethylamin sowie 24 µL (0.21 mmol) 1-Dimethylamino-2-propin werden zugefügt und die Suspension 1.5 h bei 60 - 70 °C gerührt, bis das Arylbromid vollständig umgesetzt ist (DC-Kontrolle). Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur gekühlt, auf Wasser gegossen und das Gemisch dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird nacheinander mit Wasser und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 95:5) aufgereinigt. Es werden 31 mg (0.060 mmol, 60 %) **34** als hellbrauner Feststoff erhalten.

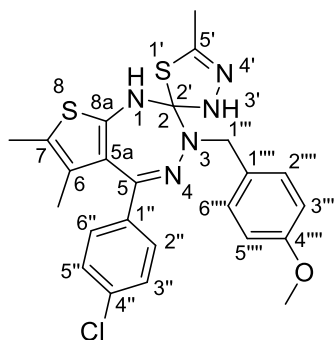
Schmelzpunkt: 142.2 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.62 (s, 1H, 10-H), 7.48 - 7.30 (m, 5H, 8-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 7.23 (dd, ³J = 8.2 Hz, 7.6 Hz, 1H, 5'''-H), 7.01 (d, ³J = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 6.97 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, 6'''-H), 6.93 - 6.92 (m, 1H, 2'''-H), 6.81 (dd, ³J = 8.2 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, 4'''-H), 4.96 (bs, 2H, 1''-H), 4.14 (s, 2H, N-CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 2.91 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.68 (s, 3H, 1-CH₃).

¹³C-NMR
δ (ppm) = 160.6 (C-6), 160.0 (C-3'''), 159.9 (C-3a), 149.0 (C-1), 138.9 (C-1'''), 135.6 (C-1'), 134.2 (C-10a), 133.2 (C-2'),

(100 MHz, CD₂Cl₂):	132.0 (C-6'), 131.7 (C-4'), 131.4 (C-8), 131.0 (C-6a), 130.6 (C-3'), 130.2 (C-7), 129.7 (C-5'''), 127.6 (C-5'), 126.3 (C-10), 124.9 (C-9), 121.6 (C-6'''), 114.9 (C-2'''), 113.2 (C-4'''), 88.7 (Ar-C≡C-CH ₂), 80.5 (Ar-C≡C-CH ₂), 58.0 (C-1''), 55.5 (OCH ₃), 47.6 (N-CH ₂), 42.3 (N(CH ₃) ₂), 12.8 (1-CH ₃).
IR (KBr):	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3059 w, 2924 w, 2558 w, 1609 s, 1560 w, 1535 m, 1523 s, 1491 m, 1437 s, 1400 w, 1349 w, 1320 m, 1265 s, 1156 m, 1039 m, 946 w, 901 w, 836 w, 774 m, 751 m, 731 w, 692 w, 642 w.
MS (ESI+):	m/z = 513, 511 [M+H] ⁺ .
HR-MS (ESI+):	m/z = 511.2008 [M+H] ⁺ (berechnet für C ₂₉ H ₂₈ ClN ₆ O ⁺ 511.2013).
HPLC-Reinheit:	t _r (254 nm): 1.712 min, 95 %.
DC:	R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH 95:5) = 0.13

5-(4-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-5',6,7-trimethyl-1,3-dihydro-3'H-spiro[thieno[2,3-e]-[1,2,4]triazepin-2,2'-[1,3,4]thiadiazol] (37)



$$M = 498.06 \text{ g/mol}$$

300 mg (0.679 mmol) 5-(4-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-1,3-dihydro-2H-thieno[2,3-e][1,2,4]triazepin-2-thion (**15**) werden in 5.5 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 165 μL (3.39 mmol) Hydrazin-Hydrat versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in 5.5 mL Ethylacetat gelöst und die Lösung dreimal mit je 5 mL Wasser gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Zwischenprodukt wird in 3.5 mL Toluol gelöst und mit 162 μL (0.882 mmol) Triethylorthoacetat und 26 mg (0.136 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt. Das Gemisch wird 2.5 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 3:1) aufgereinigt. Es werden 163 mg (0.327 mmol, 48 %) **37** als hellgelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$

(500 MHz, CD_2Cl_2):

δ (ppm) = 11.24 (s, 1H, 3'-NH), 7.30 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H, 2''''-H, 6''''-H), 7.27 - 7.20 (m, 4H, 2'''-H, 3'''-H, 5'''-H, 6'''-H), 6.87 - 6.78 (m, 3H, 1-NH, 3''''-H, 5''''-H), 4.35 - 4.28 (m, 2H, 1'''-H), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 2.46 (d, $^4J = 0.9$ Hz, 3H, 7- CH_3), 1.93 (d, $^4J = 0.9$ Hz, 3H, 6- CH_3), 1.89 (s, 3H, 5'- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$

(125 MHz, CD_2Cl_2):

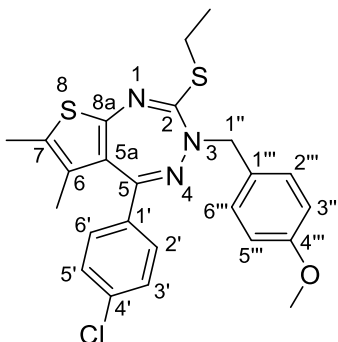
δ (ppm) = 170.1 (C_{spiro}), 159.1 (C-4'''), 151.0 (C-5'), 137.2 (C-7), 136.7 (C-4''), 136.5 (C-5), 134.2 (C-5a), 133.4 (C-1''), 133.2 (C-6), 131.9 (C-1'''), 129.9 (C-2''', C-6'''), 128.8 (C-2'', C-6''), 126.8 (C-3'', C-5''), 126.0 (C-8a), 113.9 (C-3''', C-5'''), 55.6

(OCH₃), 54.5 (C-1'''), 14.0 (7-CH₃), 12.8 (6-CH₃), 12.2 (5''-CH₃).

HR-MS (ESI+): $m/z = 498.1184$ [M+H]⁺ (berechnet für C₂₄H₂₅ClN₅OS₂⁺ 498.1189)

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 3:1) = 0.25

5-(4-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-3*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazepin (39)



$$M = 470.05 \text{ g/mol}$$

Für die S-Ethylierung des Thioharnstoffs **15** wird AAV6 befolgt. Dazu werden 1.25 g (2.83 mmol) 5-(4-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-1,3-dihydro-2*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin-2-thion (**15**) in 8.5 mL trockenem Tetrahydrofuran gelöst und 280 mg (4.25 mmol) KOH und 343 μL (4.25 mmol) Ethyliodid zugegeben. Nach Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie, werden 1.30 g (2.77 mmol, 98 %) **39** als gelber Feststoff erhalten.

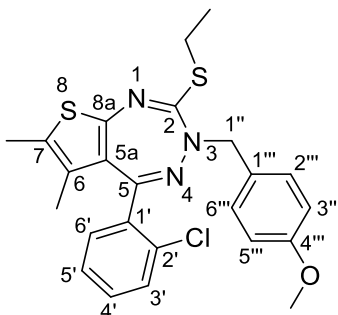
Schmelzpunkt: 73.0 - 73.8 °C

¹H-NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.32 - 7.27 (m, 4H, 3'-H, 5'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.18 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, 2'-H, 6'-H), 6.85 (d, ³*J* = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 4.79 (bs, 1H, 1''-H), 4.57 (bs, 1H, 1''-H), 3.78 (s, 3H, OCH₃), 3.08 (q, ³*J* = 7.4 Hz, 2H, S-CH₂), 2.25 (d, ⁵*J* = 0.8 Hz, 3H, 7-CH₃), 1.43 (d, ⁵*J* = 0.8 Hz, 3H, 6-CH₃), 1.33 (t, ³*J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 164.1 (C-5), 162.4 (C-2), 159.2 (C-4'''), 158.5 (C-8a), 136.1 (C-4'), 134.9 (C-1'), 130.9 (C-2', C-6'), 130.3 (C-2''', C-6'''), 130.0 (C-7), 129.7 (C-1'''), 128.8 (C-3', C-5'), 128.2 (C-5a), 127.3 (C-6), 113.9 (C-3''', C-5'''), 56.3 (C-1''), 55.6 (OCH₃), 27.3 (S-CH₂), 14.2 (6-CH₃), 14.0 (CH₂-CH₃), 13.1 (7-CH₃).

IR (Film):	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) = 3033 w, 2961 w, 2927 m, 2834 w, 1909 w, 1612 w, 1587 m, 1534 s, 1512 s, 1465 s, 1357 w, 1302 m, 1247 s, 1172 m, 1148 w, 1088 m, 1063 w, 1036 w, 1011 w, 829 m, 754 m.
MS (ESI+):	m/z = 472, 470 [M+H] ⁺ .
HR-MS (ESI+):	m/z = 470.1119 [M+H] ⁺ (berechnet für C ₂₄ H ₂₄ ClN ₃ OS ₂ ⁺ 470.1128).
HPLC-Reinheit:	t _r (254 nm): 11.368 min, 91 %.
DC:	R _f (Isohexan/Ethylacetat 20:1) = 0.19

5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-3*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazepin (40)



$$M = 470.05 \text{ g/mol}$$

Die S-Alkylierung des Thioharnstoffs **16** erfolgt nach AAV6. Dazu werden in 6.5 mL trockenem Tetrahydrofuran 950 mg (2.15 mmol) 5-(2-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-6,7-dimethyl-1,3-dihydro-2*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin-2-thion (**16**) gelöst und 213 mg (3.23 mmol) Kaliumhydroxid sowie 260 µL (3.23 mmol) Ethyliodid zugesetzt. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie werden 876 mg (1.86 mmol, 87 %) **40** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 115.2 - 116.0 °C

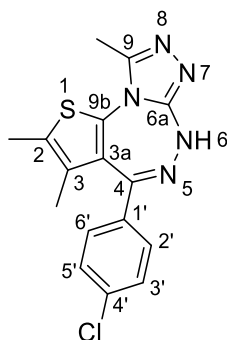
¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.34 - 7.28 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.26 - 7.18 (m, 1H, 5'-H), 7.04 - 6.97 (m, 1H, 6'-H), 6.86 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 4.68 (bs, 2H, 1''-H), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.11 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, S-CH₂), 2.20 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 7-CH₃), 1.35 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.31 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 6-CH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 163.5 (C-5), 160.9 (C-2), 159.3 (C-4'''), 157.9 (C-8a), 135.7 (C-1'), 133.7 (C-2'), 132.2 (C-6'), 130.8 (C-4'), 130.4 (C-2'', C-6''), 130.1 (C-3'), 130.0 (C-7), 129.8 (C-1'''), 128.8 (C-5a), 127.1 (C-5'), 126.9 (C-6), 113.9 (C-3''', C-5'''), 56.3 (C-1''), 55.6 (OCH₃), 27.4 (S-CH₂), 14.0 (CH₂CH₃), 13.0 (7-CH₃), 12.9 (6-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3058 w, 2960 m, 2927 m, 2835 w, 1879 w, 1611 w, 1574 w, 1530 s, 1508 s, 1461 s, 1431 m, 1365 w, 1301 w, 1243 s, 1171 m, 1082 s, 1031 m, 1003 m, 812 m, 763 m, 707 w.

MS (ESI+):	$m/z = 472, 470 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 470.1121 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{24}H_{25}ClN_3OS_2^+$ 470.1128).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 7.679 min, 90 %.
DC:	R_f (Isohexan/Ethylacetat 95:5) = 0.33

4-(4-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (41)



$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{S}$

$M = 343.83 \text{ g/mol}$

Die Entschützung des Triazolotriazepins erfolgt nach AAV7. 260 mg (0.560 mmol) 4-(4-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**17**) und 120 μL (1.12 mmol) Anisol werden in 2.5 mL HBr-Lösung 33 Gew.% in Eisessig gelöst. Nach Aufreinigung werden 175 mg (0.510 mmol, 91 %) **41** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 235.5 - 237.3 °C (Lit.: 247 °C)^[98]

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.12 (s, 1H, NH), 7.43 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.37 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 3'-H, 5'-H), 2.59 (s, 3H, 9-CH₃), 2.35 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.56 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.2 (C-4), 157.5 (C-6a), 148.3 (C-9), 136.4 (C-4'), 135.2 (C-1'), 133.3 (C-9b), 131.1 (C-3), 131.0 (C-2), 130.1 (C-3a), 130.0 (C-2', C-6'), 129.1 (C-3', C-5'), 14.5 (3-CH₃), 13.3 (2-CH₃), 12.5 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3239 m, 3168 m, 3083 m, 3007 m, 2964 m, 1612 m, 1593 m, 1570 s, 1547 s, 1512 w, 1488 m, 1417 s, 1381 w, 1267 w, 1175 w, 1090 s, 1013 m, 962 w, 932 w, 837 m, 811 w, 753 s.

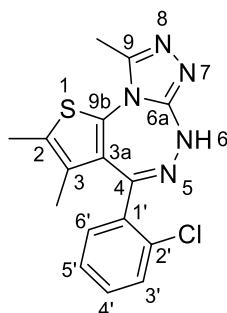
MS (ESI+): $m/z = 346, 340 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 344.0729$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{16}H_{15}ClN_5S^+$ 344.0737).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.315 min, > 99 %.

DC: R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97.5:2.5) = 0.27

**4-(2-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin
(42)**



$C_{16}H_{14}ClN_5S$

$M = 343.83 \text{ g/mol}$

Die Entschützung des Triazolothienotriazepins erfolgt nach AAV7. Hierzu werden 360 mg (0.776 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**18**) und 170 μL (1.55 mmol) Anisol in 3.5 mL einer 33%igen Bromwasserstoffsölösung in Eisessig gelöst. Nach Aufreinigung werden 239 mg (0.695 mmol, 90 %) **42** als hellbeiger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 232.6 - 234.3 °C

$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm) = 8.48 (s, 1H, NH), 7.48 (d, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H 6'-H), 7.42 - 7.30 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 2.58 (s, 3H, 9-CH₃), 2.30 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.45 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

(400 MHz, CD_2Cl_2):

$^{13}\text{C-NMR}$ δ (ppm) = 159.4 (C-4), 157.4 (C-6a), 148.2 (C-9), 135.9 (C-1'), 133.1 (C-2'), 133.0 (C-9b), 131.9 (C-6'), 131.1 (C-4'), 130.9 (C-2), 130.5 (C-3'), 130.0 (C-3), 129.5 (C-3a), 127.5 (C-5'), 13.3 (3-CH₃), 13.1 (2-CH₃), 12.7 (9-CH₃).

(100 MHz, CD_2Cl_2):

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3238 m, 3191 m, 2965 m, 2926 m, 1612 m, 1568 m, 1550 s, 1470 w, 1435 m, 1416 s, 1381 w, 1289 w, 1244 w, 1216 w, 1065 m, 1035 m, 930 w, 809 w, 756 s, 740 m.

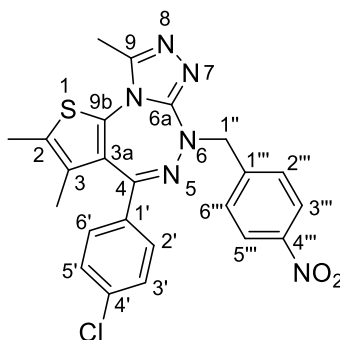
MS (ESI+): $m/z = 346, 344 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 344.0729 [\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{ClN}_5\text{S}^+$ 344.0737).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.192 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.23

4-(4-Chlorphenyl)-6-(4-nitrobenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin (43a)



$C_{23}H_{19}ClN_6O_2S$

$M = 478.95 \text{ g/mol}$

Nach AAV8 werden 94 mg (0.35 mmol) 4-Nitrobenzylbromid in 1.0 mL Tetrahydrofuran gelöst und zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(4-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**41**) sowie 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung des Rohprodukts werden 45 mg (0.094 mmol, 65 %) **43a** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 127.5 - 130.2°C

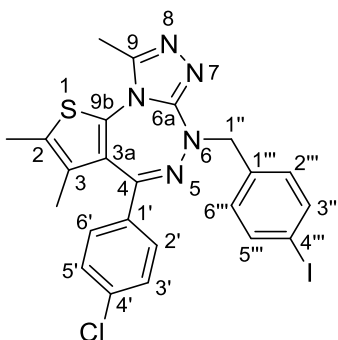
$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.18 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 7.62 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.32 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.26 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 2'-H, 6'-H), 5.20 (d, $^2J = 14.7 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 4.98 (d, $^2J = 14.7 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 2.59 (s, 3H, 9-CH₃), 2.38 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.55 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 161.1 (C-4), 158.9 (C-6a), 148.4 (C-9), 147.6 (C-4'''), 145.5 (C-1'''), 136.7 (C-4'), 134.6 (C-1'), 133.7 (C-9b), 131.0 (C-2), 130.8 (C-3), 130.1 (C-2', C-6'), 130.0 (C-2'', C-6''), 129.2 (C-3a), 129.1 (C-3', C-5'), 123.8 (C-3''', C-5'''), 57.2 (C-1''), 14.3 (3-CH₃), 13.2 (2-CH₃), 12.5 (9-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3075 w, 2968 m, 2924 m, 2857 w, 1595 w, 1566 w, 1521 s, 1489 m, 1425 m, 1344 s, 1176 w, 1091 m, 1014 m, 962 w, 838 m, 754 m, 664 w.

MS (ESI+):	$m/z = 481, 479 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 479.1048 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{23}H_{20}ClN_6O_2S^+$ 479.1057).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 2.051 min, 88 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.39

4-(4-Chlorphenyl)-6-(4-iodbenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin (43b)



$C_{23}H_{19}ClIN_5S$

$M = 559.85 \text{ g/mol}$

Nach AAV8 werden 129 mg (0.345 mmol) 4-Iodbenzylbromid in 1.0 mL Tetrahydrofuran gelöst und zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(4-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**41**) sowie 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 43 mg (0.077 mmol, 53 %) **43b** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 105.4 - 107.1 °C

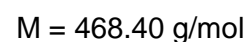
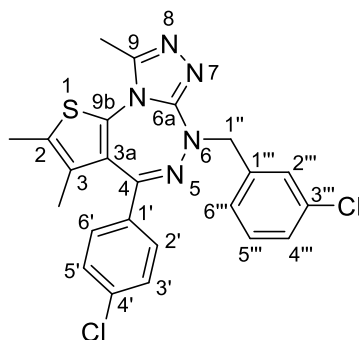
$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.66 (d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 7.33 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.28 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 2'-H, 6'-H), 7.20 (d, $^3J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 5.04 (d, $^2J = 14.2 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 4.79 (d, $^2J = 14.2 \text{ Hz}$, 1H, 1'-H), 2.58 (s, 3H, 9-CH₃), 2.36 (d, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.54 (d, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.7 (C-4), 159.1 (C-6a), 148.3 (C-9), 137.7 (C-3''', C-5'''), 137.6 (C-1'''), 136.6 (C-4'), 134.8 (C-1'), 133.7 (C-9b), 131.5 (C-2''', C-6'''), 130.8 (C-2), 130.7 (C-3), 130.1 (C-2', C-6'), 129.3 (C-3a), 129.1 (C-3', C-5'), 93.0 (C-4'''), 57.4 (C-1''), 14.3 (3-CH₃), 13.2 (2-CH₃), 12.5 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3059 w, 2968 m, 2923 m, 2860 w, 1904 w, 1590 m, 1567 m, 1536 s, 1485 s, 1423 s, 1400 w, 1279 w, 1216 w, 1091 m, 1008 m, 962 w, 900 w, 837 m, 798 w, 754 s.

MS (ESI+):	$m/z = 562, 560 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 560.0164 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{23}H_{19}ClIN_5S^+$ 560.0173).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 3.621 min, 89 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.40

**4-(4-Chlorphenyl)-6-(3-chlorbenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo-
[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (43c)**



Nach AAV8 werden 57 μL (0.35 mmol) 3-Chlorbenzylbromid zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(4-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**41**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 43 mg (0.092 mmol, 61 %) **43c** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 226.5 - 228.5 °C

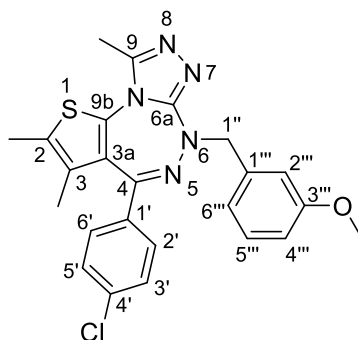
$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.43 (s, 1H, 2'''-H), 7.38 - 7.21 (m, 7H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H, 4'''-H, 5'''-H, 6'''-H), 5.08 (d, $^2J = 14.2$ Hz, 1H, 1''-H), 4.83 (d, $^2J = 14.2$ Hz, 1H, 1''-H), 2.58 (s, 3H, 9-CH₃), 2.37 (d, $^5J = 0.8$ Hz, 3H, 2-CH₃), 1.55 (d, $^5J = 0.8$ Hz, 3H, 3-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(125 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.8 (C-4), 159.1 (C-6a), 148.3 (C-9), 140.1 (C-1'''), 136.6 (C-4'), 134.8 (C-1'), 134.3 (C-3'''), 133.7 (C-9b), 130.9 (C-2), 130.8 (C-3), 130.1 (C-2', C-6'), 130.0 (C-5'''), 129.4 (C-2'''), 129.3 (C-3a), 129.1 (C-3', C-5'), 127.7 (C-6'''), 127.6 (C-2'''), 57.4 (C-1''), 14.3 (3-CH₃), 13.2 (2-CH₃), 12.5 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3066 w, 2972 m, 2924 m, 2861 w, 2478 w, 1911 w, 1660 w, 1595 m, 1567 m, 1538 s, 1489 m, 1424 s, 1382 w, 1345 w, 1279 w, 1215 m, 1092 s, 1014 m, 962 w, 902 w, 837 m, 754 s, 682 m, 665 m.

MS (ESI+):	$m/z = 470, 468 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 468.0808 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{23}H_{20}Cl_2N_5S^+$ 468.0816).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 3.104 min, 85 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.35

4-(4-Chlorphenyl)-6-(3-methoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (43d)



$C_{24}H_{22}ClN_5OS$

$M = 463.98 \text{ g/mol}$

Nach AAV8 werden 61 μL (0.35 mmol) 3-Methoxybenzylbromid zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(4-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**41**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 43 mg (0.094 mmol, 63 %) **43d** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 95.5 - 98.5 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.35 - 7.29 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 7.24 (dd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 7.6 Hz, 1H, 5'''-H), 7.01 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H, 6'''-H), 6.98 - 6.97 (m, 1H, 2'''-H), 6.80 (ddd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J = 2.7 \text{ Hz}$, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 5.10 (d, $^2J = 14.2 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 4.82 (d, $^2J = 14.2 \text{ Hz}$, 1H, 1''-H), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 2.58 (s, 3H, 9- CH_3), 2.36 (d, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 3H, 2- CH_3), 1.55 (d, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 3H, 3- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.5 (C-4), 160.0 (C-3'''), 159.3 (C-6a), 148.2 (C-9), 139.5 (C-1'''), 136.5 (C-4'), 134.9 (C-1'), 133.7 (C-9b), 130.8 (C-2), 130.7 (C-3), 130.1 (C-2', C-6'), 129.6 (C-5'''), 129.4 (C-3a), 129.1 (C-3', C-5'), 121.5 (C-6'''), 114.6 (C-2'''), 113.0 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH_3), 14.3 (3- CH_3), 13.2 (2- CH_3), 12.5 (9- CH_3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3427 m, 2996 w, 2922 m, 2834 w, 1587 s, 1566 m, 1535 s, 1489 s, 1421 s, 1319 w, 1265 s, 1091 m, 1044 m, 1013 m, 962 w, 837 m, 786 w, 736 w, 692 w, 603 w.

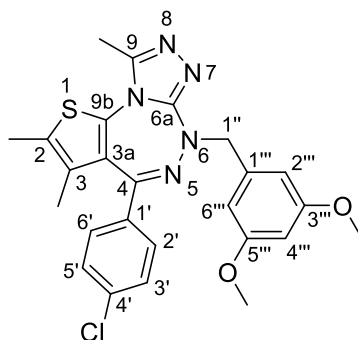
MS (ESI+): m/z = 466, 464 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 464.1303 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₄H₂₃ClN₅OS⁺ 464.1312).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.159 min, 91 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.36

4-(4-Chlorphenyl)-6-(3,5-dimethoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (43e)



$$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}$$

$$M = 494.01 \text{ g/mol}$$

Nach AAV8 werden 101 mg (0.345 mmol) 3,5-Dimethoxybenzylbromid in 1.0 mL Tetrahydrofuran gelöst und zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(4-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**41**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) sowie 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 53 mg (0.11 mmol, 78 %) **43e** als helloranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 105.5 - 106.5 °C

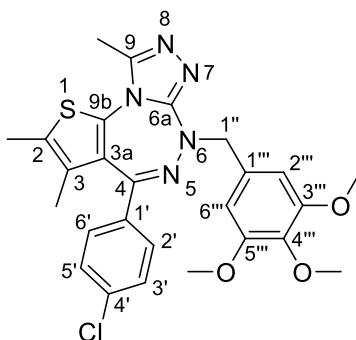
¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.35 - 7.31 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 6.57 (d, ⁴J = 2.2 Hz, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 6.36 (t, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, 4'''-H), 5.07 (d, ²J = 14.3 Hz, 1H, 1''-H), 4.79 (d, ²J = 14.3 Hz, 1H, 1''-H), 3.74 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 2.58 (s, 3H, 9-CH₃), 2.36 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 2-CH₃), 1.56 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 3-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 161.2 (C-3''', C-5'''), 160.6 (C-4), 159.3 (C-6a), 148.2 (C-9), 140.3 (C-1'''), 136.6 (C-4'), 134.9 (C-1'), 133.8 (C-9b), 130.9 (C-2), 130.7 (C-3), 130.1 (C-2', C-6'), 129.4 (C-3a), 129.1 (C-3', C-5'), 106.8 (C-2''', C-6'''), 99.5 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.6 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 14.3 (3-CH₃), 13.2 (2-CH₃), 12.5 (9-CH₃).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3000 m, 2960 m, 2932 m, 2838 w, 1597 s, 1537 m, 1461 m, 1428 m, 1361 w, 1204 s, 1154 s, 1091 m, 1067 m, 962 w, 837 m, 755 s, 665 w.

MS (ESI+):	$m/z = 496, 494 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 494.1408 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{25}H_{25}ClN_5O_2S^+$ 494.1418).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 2.066 min, 93 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.40

4-(4-Chlorphenyl)-6-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (43f)



$$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{S}$$

$$M = 524.04 \text{ g/mol}$$

Nach AAV8 werden 95 mg (0.35 mmol) 3,4,5-Trimethoxybenzylbromid gelöst in 1.0 mL Tetrahydrofuran und zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(4-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**41**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 55 mg (0.10 mmol, 72 %) **43f** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 110.3 - 111.7 °C °C

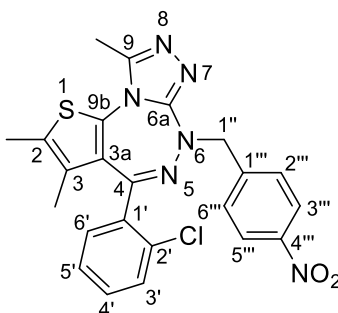
¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.35 - 7.31 (m, 4H, 2'-H, 3'-H, 5'-H, 6'-H), 6.67 (s, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 5.06 (d, ²J = 14.3 Hz, 1H, 1''-H), 4.80 (d, ²J = 14.3 Hz, 1H, 1''-H), 3.78 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 3.75 (s, 3H, 4'''-OCH₃), 2.59 (s, 3H, 9-CH₃), 2.36 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 2-CH₃), 1.55 (d, ⁵J = 0.9 Hz, 3H, 3-CH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 160.6 (C-4), 159.3 (C-6a), 153.5 (C-3''', C-5'''), 148.2 (C-9), 137.4 (C-4'''), 136.6 (C-4'), 134.8 (C-1'), 133.8 (C-9b), 133.6 (C-1'''), 130.9 (C-2), 130.6 (C-3), 130.1 (C-2', C-6'), 129.4 (C-3a), 129.1 (C-3', C-5'), 106.0 (C-2''', C-6'''), 60.8 (4'''-OCH₃), 57.9 (C-1'''), 56.3 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 14.3 (3-CH₃), 13.2 (2-CH₃), 12.5 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3006 m, 2961 m, 2935 m, 2838 w, 1592 s, 1566 m, 1536 m, 1507 m, 1461 m, 1421 s, 1361 w, 1329 m, 1234 s, 1127 s, 1013 m, 962 w, 838 m, 754 s, 665 w.

MS (ESI+):	$m/z = 526, 524 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 524.1514 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{26}H_{27}ClN_5O_3S^+$ 524.1523).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 1.709 min, 99 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.40

4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-nitrobenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin (44a)



$C_{23}H_{19}ClN_6O_2S$

$M = 478.95 \text{ g/mol}$

Nach AAV8 werden 94 mg (0.35 mmol) 4-Nitrobenzylbromid gelöst in 1.0 mL Tetrahydrofuran zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**18**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) in 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 43 mg (0.090 mmol, 62 %) **44a** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 117.6 - 119.4 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 8.20 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 7.65 (d, $^3J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.36 - 7.32 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.26 (ddd, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 5.2 Hz, $^4J = 3.7 \text{ Hz}$, 1H, 5'-H), 7.11 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 5.09 (bs, 2H, 1''-H), 2.60 (s, 3H, 9-CH₃), 2.33 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.44 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.5 (C-4), 158.7 (C-6a), 148.5 (C-9), 147.6 (C-4'''), 145.6 (C-1'''), 135.2 (C-1'), 133.6 (C-9b), 133.2 (C-2'), 131.7 (C-6'), 131.3 (C-4'), 130.7 (C-3a), 130.6 (C-3'), 130.2 (C-2'', C-6'''), 130.0 (C-2), 129.6 (C-3), 127.4 (C-5'), 123.8 (C-3''', C-5'''), 57.3 (C-1''), 13.1 (3-CH₃, 2-CH₃), 12.7 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3073 w, 2963 m, 2924 m, 1591 w, 1566 w, 1520 s, 1427 m, 1344 s, 1108 w, 1039 w, 963 w, 856 w, 757 m.

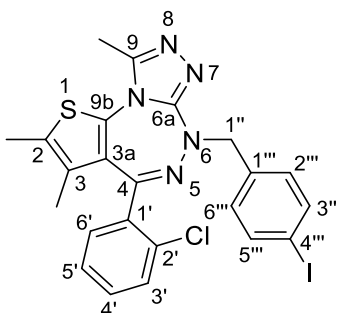
MS (ESI+): $m/z = 481, 479 [M+H]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 479.1047$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{23}H_{20}ClN_6O_2S^+$ 479.1057).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.740 min, 91 %.

DC: R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.42

4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-iodbenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin (44b**)**



$$\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{ClIN}_5\text{S}$$

$$M = 559.85 \text{ g/mol}$$

Nach AAV8 werden 129 mg (0.345 mmol) 4-Iodbenzylbromid gelöst in 1.0 mL Tetrahydrofuran und zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**18**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 70 mg (0.13 mmol, 86 %) **44b** als helloranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 118.9 - 120.3 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.67 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 7.36 - 7.32 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.30 - 7.25 (m, 1H, 5'-H), 7.23 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 2H, 6'-H), 7.17 (d, ³*J* = 8.3 Hz, 1H, 2'''-H, 6'''-H), 4.92 (bs, 2H, 1''-H), 2.58 (s, 3H, 9-CH₃), 2.31 (d, ⁵*J* = 0.9 Hz, 3H, 2-CH₃), 1.42 (d, ⁵*J* = 0.9 Hz, 3H, 3-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 160.1 (C-4), 158.8 (C-6a), 148.3 (C-9), 137.7 (C-1'''), 137.6 (C-3''', C-5'''), 135.4 (C-1'), 133.5 (C-9b), 133.2 (C-2'), 131.8 (C-6'), 131.6 (C-2''', C-6'''), 131.2 (C-4'), 130.7 (C-3a), 130.5 (C-3'), 129.9 (C-2), 129.7 (C-3), 127.4 (C-5'), 93.0 (C-4'''), 57.4 (C-1''), 13.1 (2-CH₃, 3-CH₃), 12.6 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3059 w, 2966 m, 2922 m, 2860 w, 1590 m, 1567 m, 1536 s, 1484 m, 1424 s, 1401 w, 1290 w, 1215 s, 1070 w, 1038 m, 1007 m, 962 w, 903 w, 799 w, 754 s.

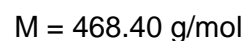
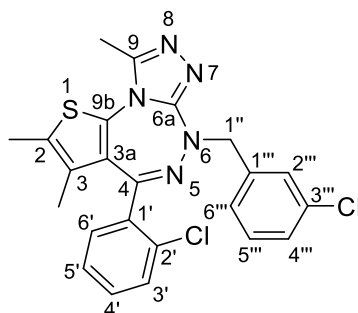
MS (ESI+): *m/z* = 562, 560 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): $m/z = 560.0164$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{23}H_{20}ClIN_5S^+$ 560.0173).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.901 min, 88 %.

DC: R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.42

4-(2-Chlorphenyl)-6-(3-chlorbenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (44c**)**



Nach AAV8 werden 57. μL (0.35 mmol) 3-Chlorbenzylbromid zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**18**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 50 mg (0.11 mmol, 73 %) **44c** als helloranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 101.0 - 103.0 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.46 (s, 1H, 2'''-H), 7.38 - 7.24 (m, 6H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 4'''-H, 5'''-H, 6'''-H), 7.16 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 4.96 (bs, 2H, 1''-H), 2.59 (s, 3H, 9-CH₃), 2.32 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.44 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.2 (C-4), 158.8 (C-6a), 148.3 (C-9), 140.0 (C-1'''), 135.4 (C-1'), 134.2 (C-3'''), 133.6 (C-9b), 133.2 (C-2'), 131.8 (C-6'), 131.2 (C-4'), 130.7 (C-3a), 130.6 (C-3'), 130.0 (C-2), 129.9 (C-5'''), 129.7 (C-3), 129.6 (C-2'''), 127.9 (C-5'), 127.7 (C-6'''), 127.4 (C-4'''), 57.4 (C-1''), 13.1 (2-CH₃), 13.0 (3-CH₃), 12.7 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3061 w, 2965 m, 2924 m, 1591 m, 1567 m, 1536 s, 1475 m, 1425 s, 1381 w, 1290 w, 1077 w, 1038 m, 963 w, 903 w, 868 w, 754 s.

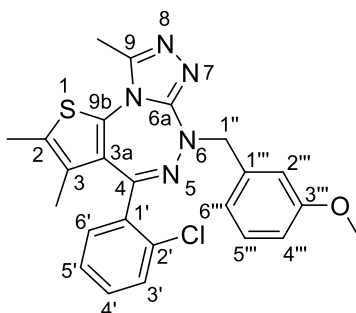
MS (ESI+): $m/z = 470, 468 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 468.0808$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{23}H_{20}Cl_2N_5S^+$ 468.0816).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.429 min, 94 %.

DC: R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.45

4-(2-Chlorphenyl)-6-(3-methoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (44d)



$C_{24}H_{22}ClN_5OS$

$M = 463.98 \text{ g/mol}$

Nach AAV8 werden 61 μL (0.35 mmol) 3-Methoxybenzylbromid zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**18**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 58 mg (0.13 mmol, 86 %) **44d** als helloranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 77.3 - 81.4 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.36 - 7.32 (m, 2H, 3'-H, 5'-H), 7.29 - 7.21 (m, 2H, 4'-H, 5'''-H), 7.19 (d, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 7.03 (ddd, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.7 \text{ Hz}$, 1.0 Hz, 1H, 6'''-H), 7.00 (ddd, 1H, $^4J = 2.7 \text{ Hz}$, 1.7 Hz, $^5J = 0.6 \text{ Hz}$, 2'''-H), 6.81 (ddd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, $^4J = 2.7 \text{ Hz}$, 1.0 Hz, 1H, 4'''-H), 4.96 (bs, 2H, 1''-H), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 2.58 (s, 3H, 9- CH_3), 2.31 (d, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 3H, 2- CH_3), 1.43 (d, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 3H, 3- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.0 (C-3'''), 159.9 (C-4), 159.0 (C-6a), 148.2 (C-9), 139.5 (C-1'''), 135.5 (C-1'), 133.5 (C-9b), 133.2 (C-2'), 131.9 (C-6'), 131.2 (C-4'), 130.6 (C-3a), 130.5 (C-3'), 129.9 (C-3), 129.8 (C-2), 129.5 (C-5'''), 127.4 (C-5'), 121.6 (C-6'''), 114.8 (C-2'''), 113.1 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.5 (OCH_3), 13.1 (2- CH_3), 13.0 (3- CH_3), 12.6 (9- CH_3).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3058 w, 2961 m, 2923 m, 2834 w, 1587 m, 1566 m, 1536 s, 1490 m, 1424 s, 1320 w, 1289 m, 1265 s, 1156 m, 1039 s, 963 w, 905 w, 750 s, 692 m.

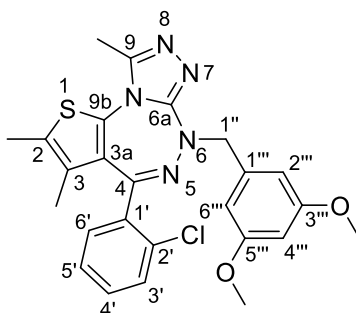
MS (ESI+): m/z = 466, 464 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 464.1303 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₄H₂₃ClN₅OS⁺ 464.1312).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.816 min, 88 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.40

4-(2-Chlorphenyl)-6-(3,5-dimethoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (44e)



$C_{25}H_{24}ClN_5O_2S$

$M = 494.01 \text{ g/mol}$

Nach AAV8 werden 101 mg (0.345 mmol) 3,5-Dimethoxybenzylbromid gelöst in 1.0 mL Tetrahydrofuran zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**18**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 43 mg (0.087 mmol, 59 %) **44e** als helloranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 89.2 - 91.3 °C

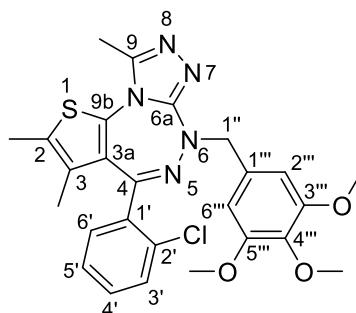
$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.35 - 7.34 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.30 - 7.26 (m, 1H, 5'-H), 7.22 (d, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 6.61 (d, $^4J = 2.3 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 6.37 (t, $^4J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H, 4'''-H), 4.93 (bs, 2H, 1''-H), 3.75 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 2.58 (s, 3H, 9-CH₃), 2.31 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 2-CH₃), 1.44 (d, $^5J = 0.9 \text{ Hz}$, 3H, 3-CH₃).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 161.1 (C-3''', C-5'''), 160.0 (C-4), 159.0 (C-6a), 148.2 (C-9), 140.3 (C-1'''), 135.5 (C-1'), 133.6 (C-9b), 133.2 (C-2'), 131.9 (C-6'), 131.2 (C-4'), 130.6 (C-3a), 130.5 (C-3'), 129.9 (C-2), 129.8 (C-3), 127.4 (C-5'), 107.0 (C-2'', C-6'''), 99.6 (C-4'''), 57.9 (C-1''), 55.6 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 13.1 (2-CH₃), 13.0 (3-CH₃), 12.6 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3060 w, 2997 m, 2959 m, 2932 m, 2837 w, 1597 s, 1566 m, 1460 m, 1428 s, 1360 w, 1321 w, 1292 w, 1204 s, 1153 s, 1067 m, 1039 w, 963 w, 834 w, 756 s, 684 w.

MS (ESI+):	$m/z = 496, 494 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 494.1408 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{25}H_{25}ClN_5O_2S^+$ 494.1418).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 1.734 min, 98 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.40

4-(2-Chlorphenyl)-6-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (44f)



M = 524.04 g/mol

Nach AAV8 werden 95 mg (0.35 mmol) 3,4,5-Trimethoxybenzylbromid gelöst in 1.0 mL Tetrahydrofuran zu einer Suspension aus 50 mg (0.15 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-2,3,9-trimethyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**18**), 6 mg (0.2 mmol) Natriumhydrid-Dispersion (60 %ig in Mineralöl) und 1.0 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Nach Aufreinigung werden 66 mg (0.13 mmol, 86 %) **44f** als hellgelber Feststoff erhalten.

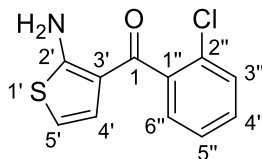
Schmelzpunkt: 112.5 - 114.2 °C

¹H-NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.37 - 7.33 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.30 - 7.23 (m, 1H, 5'-H), 7.20 (d, ³J = 7.6 Hz, 1H, 6'-H), 6.70 (s, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 4.92 (bs, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 6H, 3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 3.76 (s, 3H, 4'''-OCH₃), 2.60 (s, 3H, 9-CH₃), 2.31 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 2-CH₃), 1.43 (d, ⁵J = 0.8 Hz, 3H, 3-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 160.1 (C-4), 159.1 (C-6a), 153.5 (C-3''', C-5'''), 148.2 (C-9), 137.4 (C-4'''), 135.5 (C-1'), 133.6 (C-9b), 133.5 (C-1'''), 133.2 (C-2'), 131.9 (C-6'), 131.3 (C-4'), 130.6 (C-3'), 130.5 (C-3a), 129.9 (C-2), 129.8 (C-3), 127.4 (C-5'), 106.3 (C-2'', C-6'''), 60.8 (4'''-OCH₃), 58.0 (C-1''), 56.3 (3'''-OCH₃, 5'''-OCH₃), 13.1 (2-CH₃), 13.0 (3-CH₃), 12.7 (9-CH₃).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3061 w, 2961 m, 2936 m, 1591 s, 1567 m, 1537 m, 1507 m, 1459 m, 1421 s, 1360 w, 1328 m, 1234 m, 1126 s, 1038 w, 1007 w, 962 w, 903 w, 752 s.

MS (ESI+):	$m/z = 526, 524 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 524.1514 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{26}H_{27}ClN_5O_3S^+$ 524.1523).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 1.420 min, > 99 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.37

(2-Aminothiophen-3-yl)(2-chlorophenyl)methanon (46)C₁₁H₈ClNOS

M = 237.70 g/mol

5.00 g (27.8 mmol) 2-Chlorobenzoylacetonitril (**9**), 2.14 g (13.9 mmol) 2,5-Dihydroxy-1,4-dithian (**45**) und 2.9 mL (28 mmol) Diethylamin werden in 17 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Nach 48 h Erhitzen der Lösung auf 90 °C wird die entstandene Suspension in 1 M Natronlauge gegeben. Das Gemisch wird dreimal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser und anschließend mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 6:1 bis 3:1) wird das Rohprodukt aufgereinigt und 3.82 g (16.1 mmol, 58 %) **46** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 135.8 °C (Lit.: 137-139)^[126]

¹H-NMR δ (ppm) = 7.44 (ddd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, ⁵J = 0.7 Hz, 1H, 3''-H), 7.41 - 7.32 (m, 3H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 7.08 (s, 2H, NH₂), 6.43 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H, 4'-H), 6.09 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H, 5'-H).

¹³C-NMR δ (ppm) = 189.4 (C=O), 166.6 (C-2'), 140.7 (C-1''), 130.7 (C-4''), 130.6 (C-2''), 130.2 (C-3''), 128.7 (C-6''), 127.5 (C-5''), 127.1 (C-4'), 116.0 (C-3'), 106.9 (C-5').

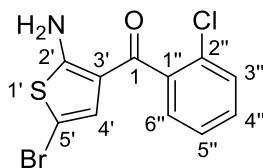
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3392 m, 3290 m, 3117 w, 2933 w, 1593 s, 1522 s, 1444 s, 1318 m, 1286 w, 1262 w, 1058 w, 837 m, 758 m, 686 s, 650 w.

MS (ESI-): m/z = 238, 236 [M-H]⁻, 200.

HR-MS (ESI+): m/z = 238.0089 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₁H₈ClNOS⁺ 238.0093).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.625 min, > 99 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.17

(2-Amino-5-bromthiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (47)C₁₁H₇BrClNOS

M = 316.60 g/mol

1.00 g (4.20 mmol) (2-Aminothiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (**46**) werden in 3.0 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst und 824 mg (4.26 mmol) *N*-Bromsuccinimid, gelöst in 3.0 mL *N,N*-Dimethylformamid, bei 0 °C unter Lichtausschluss zugegeben. Das Eisbad wird anschließend entfernt und die Lösung weitere 1.5 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Das entstehende Produkt ist in Lösung stark lichtempfindlich. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird Wasser zugegeben und das Gemisch dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Nach Aufreinigung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 5:1) werden 866 mg (2.73 mmol, 65 %) **47** als brauner Feststoff erhalten.

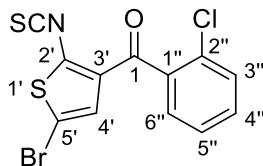
Schmelzpunkt: 129.2 °C (unter Zersetzung)

¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.45 (ddd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, 1H, 3''-H), 7.40 (ddd, ³J = 8.0 Hz, 7.2 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.36 (ddd, ³J = 7.4 Hz, 7.2 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 5''-H), 7.32 (ddd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, 1H, 6''-H), 7.13 (s, 2H, NH₂), 6.45 (s, 1H, 4'-H).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 188.5 (C=O), 166.7 (C-2'), 140.2 (C-2''), 131.0 (C-4''), 130.6 (C-1''), 130.3 (C-3''), 129.4 (C-4'), 128.6 (C-6''), 127.3 (C-5''), 116.2 (C-3'), 93.2 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3342 m, 3229 m, 3107 s, 2938 w, 1592 s, 1531 m, 1440 s, 1297 s, 1253 w, 1053 w, 940 w, 830 w, 787 w, 763 m, 738 m, 692 w.

MS (ESI+):	$m/z = 320, 318, 316 [M+H]^+, 238.$
HR-MS (ESI+):	$m/z = 315.9196 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{11}H_8BrClNOS^+$ 315.9199).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 5.142 min, > 99 %.
DC:	R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.26

(5-Brom-2-isothiocyanatothiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (48) $C_{12}H_5BrClNOS_2$

M = 358.65 g/mol

Nach AAV4 werden 850 mg (2.68 mmol) des (2-Amino-5-bromthiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (**47**) in 5.4 mL Dichlormethan gegeben. Da hierbei eine Suspension entsteht werden abweichend von AAV4 noch 1.0 mL *N,N*-Dimethylformamid zugesetzt. Die Lösung wird zu einer Suspension aus 403 mg (4.03 mmol) Calciumcarbonat und 450 μ L (5.91 mmol) Thiophosgen in 130 mL Wasser getropft. Es wird weiter AAV4 befolgt und so 719 mg (2.01 mmol, 75 %) **48** als gelbes Öl erhalten, welches bei Kühlung erstarrt.

Schmelzpunkt: 50.0 °C

$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.50 (dd, $^3J = 7.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, 3''-H), 7.50 - 7.45 (m, 1H, 4''-H), 7.43 (ddd, $^3J = 7.3$ Hz, 6.6 Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H, 5''-H), 7.40 (dd, $^3J = 7.3$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 1H, 6''-H), 7.11 (s, 1H, 4'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 186.4 (C=O), 140.2 (N=C=S), 138.6 (C-2''), 137.6 (C-2'), 134.5 (C-3'), 132.4 (C-3''), 131.3 (C-1''), 130.7 (C-4''), 130.0 (C-4'), 129.3 (C-6''), 127.7 (C-5''), 108.0 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3093 w, 2995 w, 2936 w, 2097 m, 2029 s, 1655 m, 1590 w, 1504 m, 1434 m, 1355 m, 1281 m, 1220 m, 1174 w, 1069 w, 1033 w, 960 m, 886 w, 805 w, 753 m.

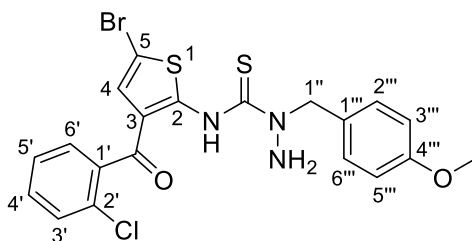
MS (ESI+): m/z = 360, 358 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): m/z = 357.8761 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{BrClNOS}_2^+$ 357.8763).

HPLC-Reinheit: Die Reinheit konnte auf Grund der schnellen Zersetzung der Verbindung nicht bestimmt werden.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.67

***N*-(5-Brom-3-(2-chlorbenzoyl)thiophen-2-yl)-1-(4-methoxybenzyl)hydrazin-1-carbothioamid (**49**)**



$$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{BrClN}_3\text{O}_2\text{S}_2$$

$$M = 510.85 \text{ g/mol}$$

306 mg (1.62 mmol) (4-Methoxybenzyl)hydrazin-Hydrochlorid (**14**) werden in 4.5 mL Methanol suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Dann werden 300 µL (1.76 mmol) Diisopropylethylamin zugesetzt. Anschließend wird eine Lösung von 525 mg (1.47 mmol) (5-Brom-2-isothiocyanatothiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (**48**) in 4.5 mL Tetrahydrofuran zugetropft. Das Eisbad wird entfernt und die Lösung 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe der Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt. Es werden 624 mg (1.22 mmol, 83 %) **49** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 192.4 °C

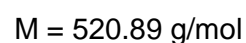
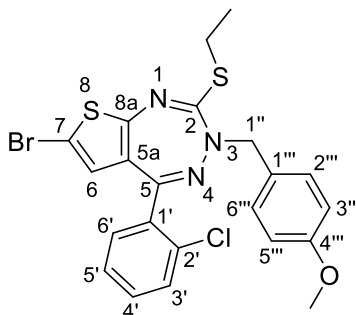
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 14.10 (s, 1H, NH), 7.46 (dd, ³J = 8.0 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, 3'-H), 7.41 (ddd, ³J = 8.0 Hz, 7.9 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 1H, 4'-H), 7.38 - 7.30 (m, 4H, 5'-H, 6'-H, 2'''-H, 6'''-H), 6.91 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.70 (s, 1H, 4-H), 5.32 (s, 2H, 1''-H), 3.95 (s, 2H, NH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 189.8 (C=O), 178.2 (C=S), 159.9 (C-4'''), 155.7 (C-2), 139.3 (C-2'), 131.0 (C-4'), 130.6 (C-1'), 130.1 (C-3'), 129.9 (C-2''', C-6'''), 128.3 (C-4), 127.3 (C-6'), 126.8 (C-5'), 126.3 (C-1'''), 121.4 (C-3), 114.6 (C-3''', C-5'''), 103.8 (C-5), 57.1 (C-1''), 55.4 (OCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3340 w, 3027 m, 2927 w, 2825 w, 1594 s, 1514 s, 1451 m, 1417 m, 1387 m, 1301 m, 1250 s, 1228 s, 1176 w, 1078 w, 1038 m, 940 w, 873 w, 836 w, 753 w.

MS (ESI+):	$m/z = 514, 512, 510 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 509.9717 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{20}H_{18}BrClN_3O_2S_2^+$ 509.9712).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 4.332 min, 96 %.
DC:	R_f (Isohexan/Ethylacetat 4:1) = 0.18

7-Brom-5-(2-chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]-triazepin (51)



Bei -25 °C wird eine Lösung von 100 mg (0.226 mmol) 5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin (**62**) in 0.25 mL Tetrahydrofuran zu 0.50 mL (0.50 mmol) einer 1 M Lösung von TMPMgCl*LiCl in Tetrahydrofuran getropft. Nach 2 h werden 50 µL (0.97 mmol) Brom zugesetzt. Die Lösung wird 1 h gerührt, dabei wird die Temperatur von -25 °C auf Raumtemperatur erhöht. Die Lösung wird in eine 5 %ige wässrige Natriumthiosulfat-Lösung gegeben und dreimal mit je 30 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zunächst mit Wasser und dann mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/*n*-Pentan 1:1) aufgereinigt. Es werden 102 mg, (0.196 mmol, 87 %) **51** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 138.3 - 140.5 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.36 - 7.32 (m, 3H, 3'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.30 (ddd, ³J = 8.1 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, 4'-H), 7.19 (ddd, ³J = 7.6 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, 5'-H), 6.93 (ddd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, ⁵J = 0.5 Hz, 1H, 6'-H), 6.87 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.31 (s, 1H, 6-H), 4.71 (s, 2H, 1''-H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.12 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, S-CH₂), 1.36 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 162.2 (C-2), 162.0 (C-5), 161.3 (C-8a), 158.9 (C-4'''), 134.6 (C-1'), 133.5 (C-2'), 131.4 (C-6'), 130.7 (C-4'), 130.0 (C-2''', C-6'''), 129.9 (C-3'), 129.1 (C-1'''), 127.8 (C-5a), 127.7

(C-6), 126.8 (C-5'), 113.7 (C-3''', C-5'''), 106.1 (C-7), 56.1 (C-1''), 55.3 (OCH₃), 27.3 (S-CH₂), 13.7 (CH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3062 w, 2961 w, 2929 m, 2833 w, 1612 m, 1587 m, 1530 s, 1514 s, 1442 s, 1365 m, 1300 m, 1250 s, 1208 w, 1173 m, 1100 m, 1036 m, 990 w, 826 m, 755 m.

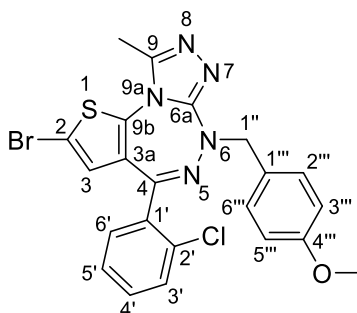
MS (ESI+): m/z = 524, 522, 520 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 519.9920 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₂H₂₀BrClN₃OS₂⁺ 519.9920).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.572 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/Isohexan 2:1) = 0.70

2-Brom-4-(2-chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo-[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (52)



$C_{22}H_{17}BrClN_5OS$

$M = 514.83 \text{ g/mol}$

Nach AAV9 werden 50 mg (0.096 mmol). 7-Brom-5-(2-chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin (**51**), 21 mg (0.29 mmol) Acethydrazid sowie 7 mg (0.04 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (0.03 mmol) in 0.3 mL Dimethylsulfoxid gelöst und abweichend von AAV9 nur 1 h bei 100 °C erhitzt. Nach Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 98.5:1.5) werden 11 mg (0.021 mmol, 22 %) **52** als hellbeiger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 204.9 - 206.6 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.40 - 7.35 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.34 - 7.27 (m, 1H, 5'-H), 7.16 (d, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 6.87 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.51 (s, 1H, 3-H), 4.91 (s, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 2.56 (s, 3H, 9- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 159.5 (C-4'''), 158.4 (C-6a), 157.0 (C-4), 148.0 (C-9), 136.9 (C-9b), 135.2 (C-1'), 133.3 (C-2'), 131.7 (C-6'), 131.5 (C-4'), 131.0 (C-2'', C-6'''), 130.5 (C-3'), 129.8 (C-3a), 129.6 (C-1'''), 129.0 (C-3), 127.54 (C-5'), 113.9 (C-3'', C-5'''), 108.8 (C-2), 57.8 (C-1''), 55.6 (OCH_3), 12.6 (9- CH_3).

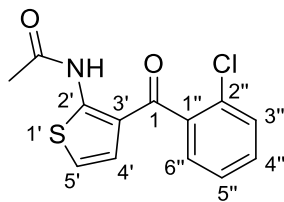
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3069 w, 3000 w, 2930 m, 2855 w, 1612 w, 1557 m, 1540 m, 1512 s, 1436 w, 1415 s, 1357 w, 1299 m, 1248 s, 1172 m, 1032 m, 968 w, 913 w, 832 m, 763 m.

MS (ESI+): $m/z = 516, 514 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 514.0104$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{22}H_{18}BrClN_5OS^+$ 514.0105).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 6.430 min, 95 %.

DC: R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 97.5:2.5) = 0.15

***N*-(3-(2-Chlorbenzoyl)thiophen-2-yl)acetamid (53)**C₁₃H₁₀ClNO₂S

M = 279.74 g/mol

500 mg (2.10 mmol) (2-Aminothiophen-3-yl)(2-chlorophenyl)methanon (**46**) werden in 1.0 mL Essigsäureanhydrid 15 min zum Rückfluss erhitzt. Dann werden 1 mL Wasser zugegeben und weitere 5 min erhitzt. Nach Kühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird diese in Wasser gegeben und dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung, dann mit Wasser und anschließend mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach dem Trocken der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Aufreinigung des Produkts mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 4:1) werden 563 mg (2.01 mmol, 96 %) **53** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 131.3 - 131.9 °C (Lit.: 132 - 132.5)^[126]

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 11.92 (s, 1H, NH), 7.48 (d, ³J = 8.0 Hz, 1H, 3''-H), 7.43 (dd, ³J = 8.3 Hz, 6.6 Hz, 1H, 5''-H), 7.40 - 7.34 (m, 2H, 4''-H, 6''-H), 6.72 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, 4'-H), 6.65 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, 5'-H), 2.37 (s, 3H, CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 191.4 (C-1), 167.9 (H₃CC=O), 151.6 (C-2'), 139.2 (C-2''), 131.0 (C-5''), 130.6 (C-1''), 130.2 (C-3''), 128.3 (C-6''), 126.7 (C-4''), 125.9 (C-4'), 120.5 (C-3'), 115.9 (C-5'), 23.7 (CH₃).

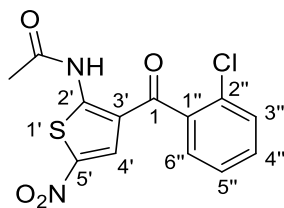
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3234 m, 3096 w, 3077 w, 2927 w, 1683 m, 1616 s, 1592 w, 1532 s, 1497 m, 1432 m, 1387 w, 1306 m, 1270 w, 1241 s, 1103 w, 1072 w, 1032 m, 944 w, 742 m.

MS (ESI+): m/z = 282, 280 [M+H]⁺, 238.

HR-MS (ESI+): $m/z = 280.0197$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{13}H_{11}ClNO_2S^+$ 280.0199).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 3.677 min, > 99 %.

DC: R_f (Ethylacetat/Isohexan 4:1) = 0.32

***N*-(3-(2-Chlorbenzoyl)-5-nitrothiophen-2-yl)acetamid (54)**C₁₃H₉ClN₂O₄S

M = 324.74 g/mol

Bei 0 °C werden 200 mg (0.715 mmol) *N*-(3-(2-Chlorbenzoyl)thiophen-2-yl)acetamid (**53**) zu 1.0 mL eines 1:1 Gemisches aus 65 %iger Salpetersäure und 96 %iger Schwefelsäure gegeben. Die Lösung wird weitere 15 min bei 0 °C gerührt und dann auf Eiswasser gegeben. Das Gemisch wird mit Natronlauge neutralisiert und anschließend dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung wird die Lösung über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 4:1) wird das Produkt aufgereinigt. Es werden 242 mg (0.745 mmol, 87 %) **54** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 182.2°C

¹H-NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 12.08 (s, 1H, NH), 7.66 (s, 1H, 4'-H), 7.55 - 7.50 (m, 2H, 3''-H, 5''-H), 7.45 (ddd, ³J = 7.6 Hz, 5.6 Hz, ⁴J = 3.0 Hz, 1H, 4''-H), 7.39 (d, ³J = 7.2 Hz, 1H, 6''-H), 2.43 (s, 3H).

¹³C-NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 192.0 (C-1), 169.5 (CH₃C=O), 154.6 (C-2'), 141.9 (C-5'), 138.2 (C-2''), 132.4 (C-5''), 130.9 (C-3''), 130.8 (C-1''), 128.9 (C-4'), 128.8 (C-6''), 127.7 (C-4''), 119.3 (C-3'), 23.9 (CH₃).

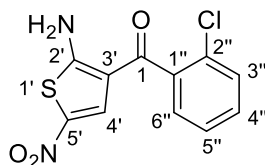
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3238 w, 3090 w, 1698 m, 1625 m, 1532 s, 1480 s, 1428 m, 1321 s, 1267 w, 1229 m, 1201 m, 1077 m, 1034 m, 938 w, 889 w, 835 w, 773 w.

MS (ESI-): m/z = 325, 323 [M-H]⁻.

HR-MS (ESI-): $m/z = 322.9902$ $[M-H]^-$ (berechnet für $C_{13}H_8ClN_2O_4S^-$ 322.9893).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.070 min, > 99 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 4:1) = 0.24

(2-Amino-5-nitrothiophen-3-yl)(2-chlorophenyl)methanon (55)C₁₁H₇ClN₂O₃S

M = 282.70 g/mol

630 mg (1.94 mmol) *N*-(3-(2-Chlorbenzoyl)-5-nitrothiophen-2-yl)acetamid (**54**) werden in 3.0 mL Tetrahydrofuran gelöst und 6.0 mL konzentrierte Salzsäure dazugegeben. Die Lösung wird 20 min bei 120 °C, 300 W und einem maximalen Druck von 9 bar im Mikrowellenreaktor erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird die Lösung in Wasser gegossen und das Gemisch dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Nach anschließendem Waschen der vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung und Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mit Hilfe der Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 4:1) wird das Produkt aufgereinigt. Es werden 314 mg (1.11 mmol, 57 %) **55** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 166.5 - 166.9 °C

¹H-NMR
(500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.81 (s, 2H, NH₂), 7.52 (s, 1H, 4'-H), 7.49 (ddd, ³J = 8.1 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, ⁵J = 0.5 Hz, 1H, 3''-H), 7.45 (ddd, ³J = 8.1 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, 1H, 4''-H), 7.39 (ddd, ³J = 7.5 Hz, 7.1 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 5''-H), 7.35 (ddd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.8 Hz, ⁵J = 0.5 Hz, 1H, 6''-H).

¹³C-NMR
(125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 190.8 (C=O), 168.5 (C-2'), 138.2 (C-2''), 132.6 (C-5'), 132.1 (C-4'), 131.5 (C-3''), 130.5 (C-1'), 130.4 (C-4''), 128.3 (C-6''), 127.1 (C-5''), 114.8 (C-3').

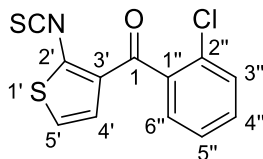
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3375 m, 3261 m, 3156 w, 1602 s, 1523 s, 1463 m, 1421 s, 1343 s, 1313 s, 1266 s, 1200 m, 1079 m, 1050 w, 956 w, 881 w, 779 w, 757 w, 732 w, 693 w.

MS (ESI-): m/z = 283, 281 [M-H]⁻.

HR-MS (ESI+): $m/z = 280.9796$ $[M-H]^-$ (berechnet für $C_{11}H_6ClN_2O_3S^-$ 280.9788).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 2.821 min, > 99 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 4:1) = 0.14

(2-Chlorphenyl)(2-isothiocyanatothiophen-3-yl)methanon (59)

$$M = 279.76 \text{ g/mol}$$

Nach AAV4 werden 2.00 g (8.41 mmol) des 2-Aminothiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanons (**46**) in 17 mL Dichlormethan gegeben. Da eine Suspension entsteht werden abweichend von AAV4 noch 1.0 mL *N,N*-Dimethylformamid zugesetzt. Die Lösung wird zu einer Suspension aus 1.26 g (12.6 mmol) Calciumcarbonat und 450 μL (18.5 mmol) Thiophosgen in 400 mL Wasser getropft. Es wird weiter AAV4 befolgt und so 3.17 g (11.3 mmol, 67 %) **59** als gelbes Öl erhalten, welches bei Kühlung kristallisiert.

Schmelzpunkt: 65.3 °C

$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.50 (ddd, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.4 \text{ Hz}$, $^5J = 0.6 \text{ Hz}$, 1H, 3''-H), 7.48 - 7.40 (m, 3H, 4''-H, 5''-H, 6''-H), 7.09 (d, $^3J = 5.8 \text{ Hz}$, 1H, 4'-H), 7.02 (d, $^3J = 5.8 \text{ Hz}$, 1H, 5'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 187.5 (C=O), 139.6 (N=C=S), 139.1 (C-1''), 137.6 (C-3'), 133.9 (C-2'), 132.2 (C-4''), 131.2 (C-2''), 130.6 (C-3''), 129.3 (C-6''), 127.6 (C-5''), 127.6 (C-4'), 121.5 (C-5').

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3105 m, 3083 w, 2124 s, 2077 s, 1660 s, 1589 m, 1518 s, 1467 w, 1434 s, 1369 m, 1300 s, 1224 m, 1064 m, 1034 w, 1009 m, 946 w, 893 m, 838 m, 794 w, 762 m.

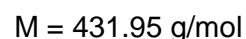
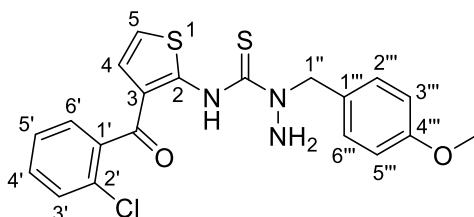
MS (ESI+): $m/z = 282, 280 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 279.9655 [\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{ClNOS}_2^+$ 279.9658).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 10.778 min, > 99 %.

DC:

R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.54

***N*-(3-(2-Chlorbenzoyl)thiophen-2-yl)-1-(4-methoxybenzyl)hydrazin-1-carbothioamid (**60**)**

1.93 g (10.2 mmol) (4-Methoxybenzyl)hydrazin-Hydrochlorid (**14**) werden in 15 mL Methanol suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Dann werden 1.9 mL (1.8 mmol) Diisopropylethylamin zugesetzt. Anschließend werden 2.60 g (9.29 mmol) (2-Isothiocyanatothiophen-3-yl)(2-chlorphenyl)methanon (**59**) in 15 mL Tetrahydrofuran gelöst und zu der methanolischen Lösung zugetropft. Das Eisbad wird entfernt und die Lösung 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Es entsteht ein brauner Niederschlag, welcher abfiltriert und mit kaltem Methanol gewaschen wird. 2.71 g (6.27 mmol, 68 %) **60** werden als brauner Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 232.3 °C

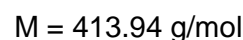
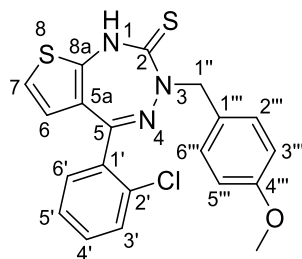
¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 14.00 (s, 1H, NH), 7.47 (dd, ³J = 7.9 Hz, ²J = 1.5 Hz, 1H, 3'-H), 7.42 (ddd, ³J = 7.9 Hz, 7.5 Hz, ⁴J = 2.0 Hz, 1H, 4'-H), 7.38 (ddd, ³J = 7.5, ⁴J = 1.5 Hz, 1H, 5'-H), 7.36 - 7.32 (m, 3H, 6'-H, 2'''-H, 6'''-H), 6.92 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.71 (d, ³J = 5.9 Hz, 1H, 4-H), 6.57 (dd, ³J = 5.9 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 1H, 5-H), 5.35 (s, 2H, 1''-H), 4.02 (s, 2H, NH₂), 3.80 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 190.8 (C=O), 178.9 (C=S), 160.2 (C-4'''), 155.5 (C-2), 140.3 (C-1'), 131.2 (C-4'), 130.7 (C-2'), 130.4 (C-3'), 130.2 (C-2''', C-6'''), 128.8 (C-6'), 127.2 (C-5'), 127.1 (C-1'''), 126.3 (C-4), 122.0 (C-3), 115.1 (C-5), 114.8 (C-3''', C-5'''), 57.3 (C-1''), 55.7 (OCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3341 m, 3071 w, 2925 w, 1599 s, 1531 s, 1509 s, 1449 m, 1416 m, 1342 w, 1313 m, 1271 m, 1249 s, 1176 w, 1100 w, 1033 m, 948 w, 882 w, 848 m, 819 w.

MS (ESI+):	$m/z = 434, 432 [M+H]^+, 414.$
HR-MS (ESI+):	$m/z = 432.0606 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{20}H_{19}ClN_3O_2S_2^+$ 432.0607).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 8.643 min, > 99 %.

5-(2-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-1,3-dihydro-2H-thieno[2,3-e][1,2,4]triazepin-2-thion (61)



In einem Mikrowellenvial werden 500 mg (1.21 mmol) *N*-(3-(2-Chlorbenzoyl)thiophen-2-yl)-1-(4-methoxybenzyl)hydrazin-1-carbothioamid (**60**) in 10 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 1.00 g (5.26 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt. Die Lösung wird 3 h bei 100 °C, 300 W und einem maximalen Druck von 9 bar im Mikrowellenreaktor erhitzt. Anschließend wird die Lösung mit Wasser versetzt und dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das braune Rohprodukt **61** wird ohne weitere Aufreinigung im S-Alkylierungsschritt eingesetzt.

Schmelzpunkt: 81.6 °C

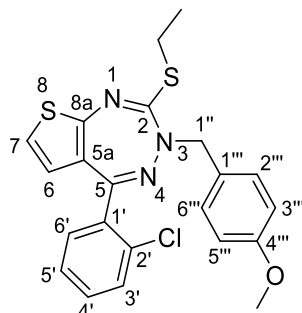
¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 8.26 (s, 1H, NH), 7.38 - 7.35 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.32 (d, ³J = 8.6 Hz, 2H, 2''-H, 6'''-H), 7.24 (ddd, ³J = 7.6 Hz, 6.2 Hz, ⁴J = 2.4 Hz, 1H, 5'-H), 6.91 - 6.83 (m, 3H, 6'-H, 3'''-H, 5'''-H), 6.71 (d, ³J = 5.7 Hz, 1H, 7-H), 6.26 (d, ³J = 5.7 Hz, 1H, 6-H), 5.21 (s, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 192.4 (C=S), 164.3 (C-5), 159.5 (C-4'''), 149.4 (C-8a), 135.1 (C-1'), 133.4 (C-2'), 131.6 (C-4'), 131.3 (C-6'), 130.4 (C-3', C-2''', C-6'''), 129.3 (C-1'''), 127.3 (C-5'), 125.5 (C-6), 125.4 (C-5a), 117.3 (C-7), 114.0 (C-3'', C-5''), 59.7 (C-1''), 55.6 (OCH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3166 m, 3019 m, 2934 m, 2836 w, 1590 m, 1562 m, 1509 s, 1434 m, 1385 w, 1318 m, 1244 s, 1173 s, 1025 m, 865 w, 825 w, 755 m, 677 w.

MS (ESI+):	$m/z = 416, 414 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 414.0503 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{20}H_{17}ClN_3OS_2^+$ 414.0502).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 7.285 min, 98 %.
DC:	R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.20

5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin (62)



$$M = 441.99 \text{ g/mol}$$

Das rohe 5-(2-Chlorphenyl)-3-(4-methoxybenzyl)-1,3-dihydro-2*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin-2-thion (**61**) (weniger als 1.21 mmol) wird in 5.0 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 116 mg (1.81 mmol) 85 %igem KOH und 142 µL (1.81 mmol) Ethyliodid versetzt. Die Lösung wird 0.5 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Lösung auf Raumtemperatur gekühlt und auf Wasser gegossen. Das Gemisch wird dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Aufreinigung des Rohprodukts mit Hilfe der Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 10:1) werden 238 mg (0.538 mmol, 45 % über 2 Synthesestufen) **62** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 83.6 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.37 - 7.30 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.23 (ddd, ³J = 7.6 Hz, 6.5 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, 5'-H), 7.00 (ddd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, 1H, 6'-H), 6.86 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.77 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H, 7-H), 6.31 (d, ³J = 5.8 Hz, 1H, 6-H), 4.70 (s, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 3H, OCH₃), 3.14 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, S-CH₂), 1.37 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 163.0 (C-5), 161.8 (C-2), 160.7 (C-8a), 159.4 (C-4'''), 135.7 (C-1'), 133.6 (C-2'), 131.8 (C-6'), 131.0 (C-4'), 130.4 (C-2''', C-6'''), 130.2 (C-3'), 129.7 (C-1'''), 127.7 (C-5a), 127.1 (C-5'), 125.8 (C-6), 118.8 (C-7), 114.0 (C-3''', C-5'''), 56.5 (C-1''), 55.6 (OCH₃), 27.6 (S-CH₂), 14.1 (CH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3107 w, 3071 w, 2954 w, 2929 m, 2836 w, 1608 m, 1583 m, 1541 s, 1510 m, 1438 m, 1362 w, 1301 w, 1254 s, 1173 w, 1123 w, 1081 m, 1033 m, 982 w, 862 m.

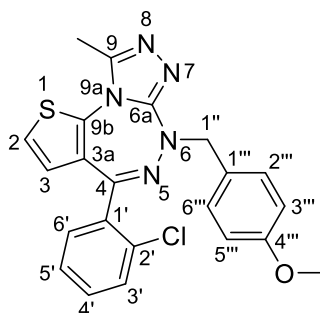
MS (ESI+): m/z = 444, 442 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 442.0814 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₂H₂₁ClN₃OS₂⁺ 442.0815).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.293 min, > 99 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 6:1) = 0.43

4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin (63)



$C_{22}H_{18}ClN_5OS$

$M = 435.93 \text{ g/mol}$

In einem Mikrowellenvial werden 310 mg (0.701 mmol) 5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin (**62**), 156 mg (2.10 mmol) Acethydrazid und 60 mg (0.32) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat in 3.5 mL Dimethylsulfoxid gelöst und nach AAV 9 umgesetzt. Mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1) wird das Produkt aufgereinigt. Es werden 133 mg (0.384 mmol, 55 %) **63** als beiger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 92.8 °C

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 7.40 - 7.35 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.33 - 7.26 (m, 1H, 5'-H), 7.20 (ddd, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 7.10 (d, $^3J = 5.7 \text{ Hz}$, 1H, 2-H), 6.86 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.49 (d, $^3J = 5.7 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 4.93 (s, 2H, 1''-H), 3.79 (s, 3H, OCH_3), 2.60 (s, 3H, 9- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 159.4 (C-4'''), 158.3 (C-4), 158.1 (C-6a), 148.3 (C-9), 137.0 (C-9b), 135.8 (C-1'), 133.4 (C-2'), 131.7 (C-6'), 131.3 (C-4'), 131.0 (C-2''', C-6'''), 130.4 (C-3'), 129.8 (C-1'''), 129.4 (C-3a), 127.4 (C-5'), 126.6 (C-3), 120.9 (C-2), 113.9 (C-3''', C-5'''), 57.9 (C-1''), 55.6 (OCH_3), 12.8 (9- CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3028 w, 2980 w, 2845 w, 1557 m, 1538 m, 1510 s, 1415 m, 1301 w, 1247 s, 1174 w, 1032 m, 874 w, 761 w.

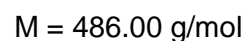
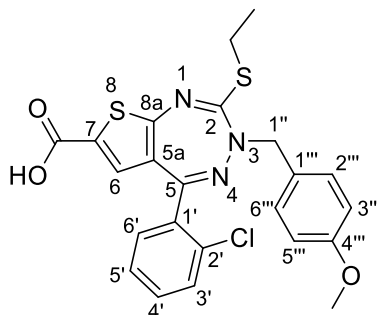
MS (ESI+): $m/z = 438, 436 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 436.0998$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{22}H_{19}ClN_5OS^+$ 436.0999).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 3.237 min, > 99 %.

DC: R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.50

5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin-7-carbonsäure (73**)**



680 mg (1.29 mmol) Allyl-5-(2-chlorophenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin-7-carboxylat (**75**) werden in 3.4 mL Tetrahydrofuran gelöst und mit 150 mg (0.130 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) sowie 1.1 mL (13 mmol) Morpholin versetzt. Die Suspension wird 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend in 1 M Salzsäure gegeben und das Gemisch dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser sowie gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann in Diethylether umkristallisiert werden. Die konzentrierte Mutterlauge wird mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/Essigsäure 94.95:5:0.05) aufgereinigt. Es werden insgesamt 628 mg (1.29 mmol, 100 %) **73** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 227.4 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) = 13.21 (bs, 1H, COOH), 7.54 - 7.45 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.39 (ddd, ³J = 7.4 Hz, 6.5 Hz, ⁴J = 2.2 Hz, 1H, 5'-H), 7.30 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.02 (ddd, ³J = 7.4 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, ⁵J = 0.5 Hz, 1H, 6'-H), 6.91 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.80 (s, 1H, 6-H), 4.67 (s, 2H, 1''-H), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 3.13 (q, ³J = 7.3 Hz, 2H, S-CH₂), 1.32 (t, ³J = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-D₆): δ (ppm) = 164.5 (C-2), 163.3 (C=O), 162.6 (C-8a), 161.6 (C-5), 158.4 (C-4'''), 133.8 (C-1'), 131.8 (C-2'), 131.4 (C-4'), 131.1 (C-6'), 130.1 (C-6), 129.8 (C-2'', C-6''), 129.7 (C-3'), 128.3 (C-

1'''), 127.4 (C-7), 127.3 (C-5'), 126.5 (C-5a), 113.6 (C-3'''), C-5'''), 55.3 (C-1''), 54.9 (OCH₃), 26.7 (S-CH₂), 13.5 (CH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3073 w, 2929 w, 2853 w, 1663 s, 1609 w, 1512 s, 1438 s, 1360 w, 1298 m, 1237 m, 1173 m, 1258 m, 1078 w, 1032 w, 974 w, 850 w, 826 w, 754 m, 722 w.

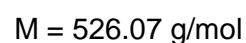
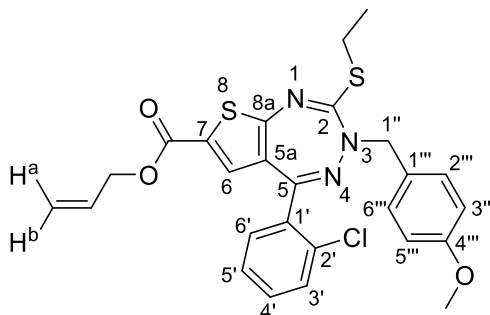
MS (ESI+): m/z = 488, 486 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 486.0712 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₃H₂₁ClN₃O₃S₂⁺ 486.0713).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.067 min, 96 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH/AcOH 94.9:5:0.1) = 0.33

Allyl-5-(2-chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazepin-7-carboxylat (75**)**



1.15 g (2.60 mmol) 5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazepin (**62**) werden in 2.65 mL Tetrahydrofuran gelöst und zu 5.72 mL (5.72 mmol) einer auf -25 °C gekühlten 1 M Lösung von TMPMgCl*LiCl in Tetrahydrofuran getropft. Es wird 2 h gerührt, dann werden 900 µL (5.98 mmol) TMEDA zugesetzt und nach weiteren 10 min Rühren werden 1.0 mL (9.40 mmol) Allylchlorformiat zugegeben. Die Lösung wird innerhalb von 4 h auf 0 °C erwärmt und dann auf Eiswasser gegossen. Das Gemisch wird dreimal mit je 70 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/Isohexan 2:1) aufgereinigt. Es werden 607 mg (1.15 mmol, 44 %) **75** als oranger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 88.8°C

¹H-NMR
(400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.35 - 7.28 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.20 (ddd, ³J = 7.6 Hz, 6.6 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, 5'-H), 7.03 (s, 1H, 6-H), 6.91 (ddd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.5 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, 1H, 6'-H), 6.87 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 5.95 (ddt, ³J = 17.2 Hz, 10.4 Hz, 5.7 Hz, 1H, CH_{Allyl}), 5.35 (dq, ³J = 17.2 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, 1H, H^a_{Allyl}), 5.25 (dq, ³J = 10.4 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1H, H^b_{Allyl}), 4.72 (m, 4H, O-CH₂, 1''-H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.15 (q, ³J = 7.4 Hz, 2H, S-CH₂), 1.38 (t, ³J = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 165.4 (C-2), 165.3 (C=O), 162.6 (C-5), 161.9 (C-8a), 158.9 (C-4'''), 134.5 (C-1'), 133.4 (C-2'), 132.1 (C-6), 131.9

(CH_{Allyl}), 131.4 (C-6'), 130.9 (C-4'), 130.1 (C-3'), 130.0 (C-2''', C-6'''), 128.9 (C-1'''), 127.9 (C-7), 126.8 (C-5'), 124.4 (C-5a), 118.5 (=CH_{2Allyl}), 113.7 (C-3''', C-5'''), 65.7 (OCH_{2Allyl}), 56.1 (C-1''), 55.3 (OCH₃), 27.5 (S-CH₂), 13.7 (CH₂CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3073 w, 2963 w, 2941 w, 2879 w, 2839 w, 1749 w, 1714 s, 1613 m, 1588 m, 1516 s, 1445 s, 1362 w, 1278 m, 1249 s, 1173 m, 1112 m, 997 m, 930 w, 761 m.

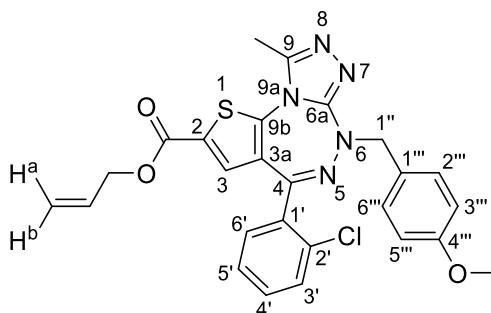
MS (ESI+): m/z = 528, 526 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 526.1026 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₆H₂₅ClN₃O₃S₂⁺ 526.1026).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 5.995 min, 97 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/Isohexan 2:1) = 0.48

Allyl-4-(2-chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-2-carboxylat (76**)**



$C_{26}H_{22}ClN_5O_3S$

$M = 520.00 \text{ g/mol}$

In 250 μL Dimethylsulfoxid werden 30 mg (0.057 mmol) Allyl-5-(2-chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin-7-carboxylat (**75**), 5 mg (0.07 mmol) Acethydrazid sowie 10 mg (3.71 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat gelöst. Im Mikrowellenreaktor wird die Lösung 2 h bei 120 $^{\circ}\text{C}$, 300 W und einem maximalen Druck von 9 bar erhitzt und anschließend wie in AAV9 beschrieben aufgearbeitet. Mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 97.5:2.5) werden 5 mg (0.01 mmol, 18 %) **76** als brauner Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 146.6 $^{\circ}\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, DMSO- D_6): δ (ppm) = 7.38 - 7.34 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.31 - 7.25 (m, 1H, 5'-H), 7.15 (s, 1H, 3-H), 7.11 (ddd, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, 0.7 Hz, 1H, 6'-H), 6.88 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 5.96 (ddt, $^3J = 17.2 \text{ Hz}$, 10.4 Hz, 5.9 Hz, 1H, CH_{Allyl}), 5.38 (dq, $^3J = 17.2 \text{ Hz}$, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{a}}_{\text{Allyl}}$), 5.31 (dq, $^3J = 10.4 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, $\text{H}^{\text{b}}_{\text{Allyl}}$), 4.97 (s, 2H, 1''-H), 4.77 (ddd, $^3J = 5.8 \text{ Hz}$, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, 1.2 Hz, 2H, O-CH_2), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 2.67 (s, 3H, 9- CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CD_2Cl_2): δ (ppm) = 160.6 (C=O), 159.0 ($\text{C-4}''''$), 158.1 (C-6a), 157.1 (C-4), 147.8 (C-9), 140.9 (C-9b), 134.6 ($\text{C-1}'$), 132.9 ($\text{C-2}'$), 132.0 (C-3), 131.4 (CH_{Allyl}), 131.3 ($\text{C-4}'$), 131.2 ($\text{C-6}'$), 130.7 ($\text{C-2}''''$), $\text{C-6}''''$), 130.2 ($\text{C-3}'$), 129.6 ($\text{C-1}'''$), 129.0 (C-3a), 128.1 (C-2),

127.3 (C-5'), 119.5 (=CH₂_{Allyl}), 113.6 (C-3''', C-5'''), 66.5 (O-CH₂), 57.5 (C-1''), 55.3 (OCH₃), 12.7 (9-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3081 w, 3004 w, 2923 w, 2852 w, 1714 s, 1610 w, 1560 w, 1513 s, 1472 m, 1372 m, 1245 s, 1173 s, 1066 w, 1029 m, 938 w, 822 w, 750 m, 732 m, 654 w.

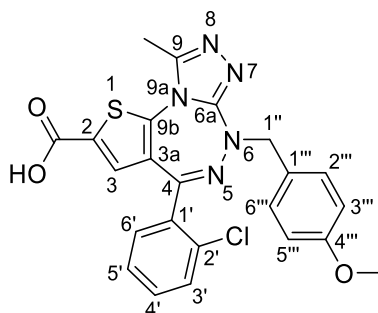
MS (ESI+): m/z = 522, 520 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): m/z = 520.1211 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₆H₂₃ClN₅O₃S⁺ 520.1210).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 10.059 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 97.5:2.5) = 0.17

4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-2-carbonsäure (77**)**



$$\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{S}$$

$$M = 479.94 \text{ g/mol}$$

Nach AAV9 werden 600 mg (1.23 mmol) 5-(2-Chlorphenyl)-2-(ethylthio)-3-(4-methoxybenzyl)-3*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazepin-7-carbonsäure (**73**) in 2.8 mL Dimethylsulfoxid gelöst und mit 115 mg (0.615 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat sowie 275 mg (3.71 mmol) Acethydrazid umgesetzt. Nach Aufreinigung mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol/Essigsäure 97.45:2.5:0.05) werden 217 mg (0.453, 37 %) **77** als hellbeiger Feststoff erhalten.

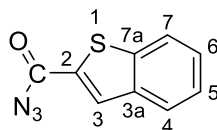
Schmelzpunkt: 344.6 °C

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 7.48 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.40 (ddd, ³*J* = 7.6 Hz, 6.8 Hz, ⁴*J* = 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 7.33 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.26 (dd, ³*J* = 7.6 Hz, ⁴*J* = 1.5 Hz, 1H, 6'-H), 6.89 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.55 (s, 1H, 3-H), 4.82 (s, 2H, 1''-H), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 2.55 (s, 3H, 9-CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 162.4 (C=O), 158.3 (C-4'''), 157.7 (C-4), 156.8 (C-6a), 147.8 (C-9), 142.5 (C-9b), 136.7 (C-2), 134.9 (C-1'), 131.8 (C-2'), 131.2 (C-4'), 130.9 (C-6'), 130.2 (C-2'', C-6''), 129.7 (C-3'), 128.9 (C-1'''), 127.9 (C-3a), 127.3 (C-5'), 124.7 (C-3), 113.4 (C-3''', C-5'''), 56.7 (C-1''), 54.9 (OCH₃), 12.0 (C-9).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3067 w, 2913 w, 1589 s, 1538 m, 1514 s, 1488 m, 1438 w, 1391 s, 1379 m, 1303 w, 1250 m, 1175 w, 1060 w, 1035 m, 847 w, 822 w, 780 m, 765 m.

MS (ESI-):	$m/z = 480, 478 [M-H]^-$, 434.
HR-MS (ESI-):	$m/z = 478.0750 [M-H]^-$ (berechnet für $C_{23}H_{19}ClN_5O_3S^-$ 478.0741).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 1.099 min, > 99 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.15

Benzo[*b*]thiophen-2-carbonylazid (79**)** $\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_3\text{OS}$ $M_r = 203.22 \text{ g/mol}$

500 mg (2.81 mmol) Benzothiophen-2-carbonsäure (**78**) werden in 5.0 mL Dimethylformamid gelöst und 610 μL (2.81 mmol) Diphenylphosphorylazid sowie 470 μL (3.37 mmol) Triethylamin zugegeben. Die Lösung wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (Isohexan/Ethylacetat 10:1) aufgereinigt. Es werden 566 mg (2.79 mmol, 99 %) **79** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 107.8 - 108.4 °C (Lit.: 107 - 108 °C)^[166]

$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.10 (d, $^4J = 0.8 \text{ Hz}$, 1H), 7.91 - 7.86 (m, 2H, 4-H, 7-H), 7.49 (ddd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 7.1 Hz, $^4J = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 7.43 (ddd, $^3J = 8.2 \text{ Hz}$, 7.1 Hz, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, 5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 167.6 (C=O), 143.0 (C-7b), 138.7 (C-3a), 134.5 (C-2), 131.7 (C-3), 127.8 (C-6), 126.0 (C-4), 125.3 (C-5), 122.9 (C-7).

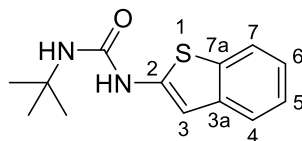
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3308 w, 3065 w, 2925 w, 2853 w, 2153 s, 1665 s, 1589 w, 1510 s, 1421 m, 1336 m, 1268 s, 1240 m, 1215 s, 1190 s, 1152 w, 1069 w, 929 m, 818 w, 754 m.

MS (EI): m/z (rel. Int. in %) = 203 (83) $[\text{M}]^{+}$, 161 (100), 120 (74).

HR-MS (EI): $m/z = 203.0144$ $[\text{M}]^{+}$ (berechnet für $\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_3\text{OS}^{+}$ 203.0153).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 3.752 min, > 99 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 3:1) = 0.80

1-(Benzo[*b*]thiophen-2-yl)-3-(*tert*-butyl)harnstoff (81) $C_{13}H_{16}N_2OS$ $M_r = 248.34 \text{ g/mol}$

100 mg (0.492 mmol) Benzo[*b*]thiophen-2-carbonylazid (**79**) werden in 4.0 mL Toluol 1.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur, werden 88 μL (0.84 mmol) *tert*-Butylamin zugetropft und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 110 mg (0.443 mmol, 90 %) **81** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 191.7 - 194.5 °C

$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.86 (s, 1H, 2-NH), 7.66 (d, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 7.51 (ddd, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 0.7 Hz, 1H, 4-H), 7.28 - 7.23 (m, 1H, 5-H), 7.17 (ddd, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 7.2 Hz, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, 6-H), 6.69 (d, $^4J = 0.7 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 5.47 (s, 1H, *t*Bu-NH), 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$
(125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 154.3 (C=O), 141.1 (C-2), 137.9 (C-3a), 135.3 (C-7a), 124.4 (C-5), 122.7 (C-6), 121.8 (C-7, C-4), 107.2 (C-3), 51.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

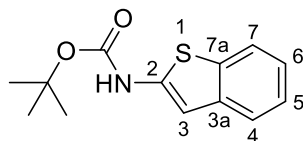
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3326 w, 3045 w, 2958 w, 1645 s, 1596 m, 1557 s, 1455 m, 1436 m, 1394 w, 1363 w, 1282 s, 1208 m, 1173 w, 790 m, 744 m, 725 m.

MS (ESI+): $m/z = 249 [\text{M}+\text{H}]^+$.

HR-MS (ESI+): $m/z = 249.1057 [\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{OS}^+$ 249.1062).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 3.150 min, > 99 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 3:1) = 0.25

***tert*-Butyl benzo[*b*]thiophen-2-ylcarbamate (**82**)** $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$ $M_r = 249.33 \text{ g/mol}$

50 mg (0.25 mmol) Benzo[*b*]thiophen-2-carbonylazid (**79**) werden in 0.5 mL *tert*-Butanol zum 8 h Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das **82** in quantitativer Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 94.9 - 96.2 °C (Lit.: 100 - 101 °C)^[166]

¹H-NMR (500 MHz, MeOD-D4): δ (ppm) = 7.67 (dd, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, $^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 0.78H, 7-H), 7.52 (dd, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 0.78H, 4-H), 7.24 (ddd, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 7.7 Hz, $^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 0.78H, 5-H), 7.14 (ddd, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 7.6 Hz, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 0.78H, 6-H), 6.73 (s, 0.78H, 3-H), 1.53 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Rotamer: 7.71 (d, $^3J = 7.6 \text{ Hz}$, 0.12H, 7-H), 7.58 (d, $^3J = 7.7 \text{ Hz}$, 0.12H, 4-H), 7.28 - 7.27 (m, 0.12H, 5-H), 7.21 - 7.17 (m, 1H, 6-H), 6.85 (s, 0.12H, 3-H).

¹³C-NMR (125 MHz, MeOD-D4): δ (ppm) = 154.6 (C=O), 142.7 (C-2), 139.7 (C-3a), 136.1 (C-7a), 125.3 (C-5), 123.4 (C-6), 122.6 (C-4), 122.5 (C-7), 106.2 (C-3), 81.9 (C(CH₃)₃), 28.6 (C(CH₃)₃).

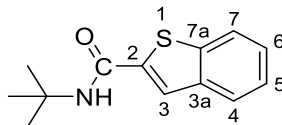
Rotamer: 153.2 (C=O), 142.0 (C-2), 139.4 (C-3a), 136.5 (C-7a), 125.4 (C-5), 123.7 (C-6), 122.8 (C-4), 122.5 (C-7), 107.3 (C-3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3298 m, 3056 w, 2977 w, 2919 w, 2850 w, 1684 m, 1638 m, 1575 s, 1551 s, 1456 m, 1369 w, 1331 w, 1302 w, 1233 m, 1155 m, 1054 w, 936 w, 818 w, 748 m.

MS (ESI-): $m/z = 248 [\text{M-H}]^-$, 148.

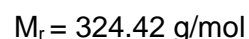
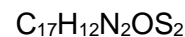
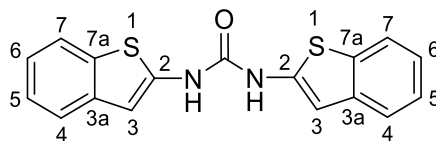
HR-MS (ESI-): $m/z = 248.0753$ $[M-H]^-$ (berechnet für $C_{13}H_{14}NO_2S^-$ 248.0745).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 6.959 min, > 99 %.

***N*-(*tert*-Butyl)benzo[*b*]thiophene-2-carboxamid (**83**)** $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NOS}$ $M_r = 233.33 \text{ g/mol}$

50 mg (0.25 mmol) Benzo[*b*]thiophen-2-carbonylazid (**79**) werden in 0.5 mL *tert*-Butylamin und 0.5 mL 1,4-Dioxan 1.5 h zum Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 48 mg (0.20 mmol, 80 %) als **83** als farbloser Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt:	165.3 - 166.0 °C
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3):	δ (ppm) = 7.84 (d, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 1H, 7-H), 7.81 (dd, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, $^4J = 0.8 \text{ Hz}$, 1H, 4-H), 7.68 (d, $^4J = 0.8 \text{ Hz}$, 1H, 3-H), 7.41 (dd, $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, 5.5 Hz, 1H, 5-H), 7.38 (dd, $^3J = 7.2 \text{ Hz}$, 5.5 Hz, 1H, 6-H), 5.94 (s, 1H, NH) 1.49 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3):	δ (ppm) = 161.6 (C=O), 140.7 (C-7a), 140.0 (C-2), 139.1 (C-3a), 126.1 (C-5), 124.9 (C-4), 124.8 (C-6), 124.5 (C-3), 122.7 (C-7), 52.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
IR (ATR):	$\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3287 m, 3057 w, 2984 w, 1631 s, 1543 s, 1455 m, 1388 w, 1335 w, 1305 m, 1216 m, 1196 m, 1090 w, 1010 w, 939 w, 867 w, 841 w, 763 m, 741 m, 723 m.
MS (ESI+):	$m/z = 234 [\text{M}+\text{H}]^+$, 178.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 234.0948 [\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NOS}^+$ 234.0953).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 2.740 min, > 99 %.
DC:	R_f (Isohexan/Ethylacetat 3:1) = 0.50

1,3-Bis(benzo[*b*]thiophen-2-yl)harnstoff (84)

50 mg (0.25 mmol) Benzo[*b*]thiophen-2-carbonylazid (**79**) wird in 1.5 mL 1,4-Dioxan und 50 μL Wasser 1 h zum Rückfluss erhitzt. Es fällt ein Feststoff aus der nach Erkalten der Suspension filtriert wird. Es werden 37 mg (0.11 mmol, 88 %) **84** als beiger Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 258.3 - 260.5 °C (Lit.: 273 - 275 °C)^[166]

¹H-NMR
(400 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 10.69 (s, 2H, NH), 7.79 (d, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H, 7-H), 7.57 (d, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, 2H, 4-H), 7.26 (ddd, $^3J = 7.9 \text{ Hz}$, 7.1 Hz, $^4J = 1.1 \text{ Hz}$, 2H, 5-H), 7.17 (ddd, $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 7.1 Hz, $^4J = 1.2 \text{ Hz}$, 2H, 6-H), 6.91 (d, $^4J = 0.8 \text{ Hz}$, 2H, 3-H).

¹³C-NMR
(100 MHz, DMSO-*D*₆): δ (ppm) = 150.9 (C=O), 141.0 (C-2), 137.5 (C-3a), 134.1 (C-7a), 124.2 (C-5), 122.0 (C-6), 121.6 (C-7), 121.3 (C-4), 104.8 (C-3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3261 m, 3056 w, 2928 w, 1783 w, 1737 m, 1694 m, 1602 s, 1575 s, 1529 m, 1457 m, 1438 m, 1280 s, 1245 m, 1190 w, 1048 w, 1025 m, 1004 w, 818 w, 758 w.

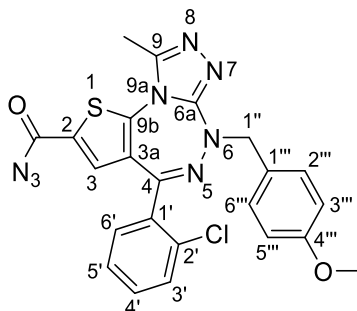
MS (ESI-): $m/z = 324, 323 [\text{M-H}]^-$.

HR-MS (ESI-): $m/z = 323.0322 [\text{M-H}]^-$ (berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{OS}_2^-$ 323.0313).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 5.258 min, 82 %.

DC: R_f (Isohexan/Ethylacetat 1:1) = 0.50

4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*]-[1,2,4]triazepin-2-carbonsäureazid (85**)**



M = 504.95 g/mol

43 mg (0.089 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-2-carboxylsäure (**77**) werden in 1.0 mL Dimethylformamid gelöst und 23 µL (0.11 mmol) Diphenylphosphorylazid sowie 18 µL (0.13 mmol) Triethylamin zugesetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat/*n*-Pentan 1:1 bis 2:1) aufgereinigt. Es werden 43 mg (0.085 mmol, 96 %) **85** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 201.4 - 203.7 °C

¹H-NMR
(400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.41 - 7.33 (m, 4H, 3'-H, 4'-H, 2'''-H, 6'''-H), 7.29 (ddd, ³J = 7.6 Hz, 6.6 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 1H, 5'-H), 7.16 (s, 1H, 3-H), 7.12 (ddd, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.6 Hz, ⁵J = 0.6 Hz, 1H, 6'-H), 6.88 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 4.97 (s, 2H, 1''-H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 2.67 (s, 3H, 9-CH₃).

¹³C-NMR
(100 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 165.7 (C=O), 159.0 (C-4'''), 158.0 (C-4), 156.7 (C-6a), 147.8 (C-9), 142.5 (C-9b), 134.5 (C-1'), 132.9 (C-3), 132.8 (C-2'), 131.4 (C-4', C-6'), 130.7 (C-2'', C-6''), 130.3 (C-3'), 130.0 (C-2), 129.2 (C-3a), 128.8 (C-1'''), 127.3 (C-5'), 113.7 (C-3'', C-5''), 57.6 (C-1''), 55.3 (OCH₃), 12.7 (9-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3074 w, 2980 w, 2911 w, 2838 w, 2162 s, 2125 m, 1672 s, 1613 w, 1516 s, 1477 m, 1368 w, 1258 s, 1204 s, 1170 m, 1107 w, 1029 m, 939 m, 820 m, 759 w.

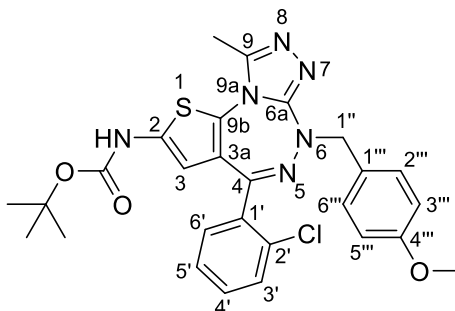
MS (ESI+): m/z = 507, 505 [M+H]⁺, 477.

HR-MS (ESI+): $m/z = 505.0960$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{23}H_{18}ClN_8O_2S^+$ 505.0962).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 3.635 min, 97 %.

DC: R_f (Ethylacetat/*n*-Pentan 2:1) = 0.56

***tert*-Butyl (4-(2-chlorophenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*]-[1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-2-yl)carbamat (**86**)**



$C_{27}H_{27}ClN_6O_3S$

$M = 551.06 \text{ g/mol}$

28 mg (0.055 mmol) 4-(2-Chlorophenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-2-carbonsäureazid (**85**) werden in 1 mL Butanol und 0.5 mL 1,4-Dioxan gelöst und 3 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 98:2) aufgereinigt. Es werden 15 mg (0.027 mmol, 49 %) **86** als gelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 152.7 - 156.3 °C

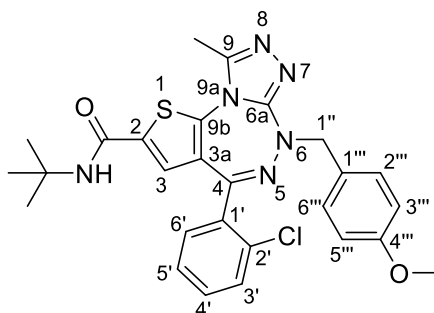
$^1\text{H-NMR}$
(400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.42 (s, 1H, NH), 7.36 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.32 - 7.28 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.22 (ddd, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, 5.7 Hz, $^4J = 3.1 \text{ Hz}$, 1H, 5'-H), 7.07 (ddd, $^3J = 7.4 \text{ Hz}$, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, $^5J = 0.6 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 6.86 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 5.82 (s, 1H, 3'-H), 4.93 (s, 2H, 1''-H), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 2.64 (s, 3H, 9- CH_3), 1.50 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$
(100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 158.8 (C-4'''), 158.4 (C-4), 157.9 (C-6a), 152.3 (C=O), 147.6 (C-9), 136.1 (C-2), 135.2 (C-1'), 133.1 (C-2'), 131.3 (C-6'), 130.8 (C-4'), 130.6 (C-2''', C-6'''), 130.0 (C-3'), 129.5 (C-1'''), 128.4 (C-9b), 127.0 (C-5'), 126.3 (C-3a), 113.6 (C-3''', C-5'''), 106.9 (C-3), 82.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 57.3 (C-1''), 55.3 (OCH_3), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 12.7 (9- CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3179 w, 3023 s, 2935 m, 2839 w, 1704 s, 1551 s, 1513 s, 1422 m, 1366 m, 1287 m, 1247 s, 1157 s, 1035 m, 860 w, 822 w, 759 w, 733 w.

MS (ESI+):	$m/z = 553, 551 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 551.1631 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{27}H_{28}ClN_6O_3S^+$ 551.1632).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 3.123 min, 98 %.
DC:	R_f ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5) = 0.48

***N*-(*tert*-Butyl)-4-(2-chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-2-carboxamid (**87**)**



$C_{27}H_{27}ClN_6O_2S$

$M = 535.06 \text{ g/mol}$

15 mg (0.030 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]-triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-2-carbonsäureazid (**85**) werden in 1.0 mL *tert*-Butylamin und 0.5 mL 1,4-Dioxan 0.5 h zum Rückfluss erhitzt. Dann wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat/*n*-Pentan 1:1 bis 2:1). Es werden 13 mg (0.024 mmol, 81 %) **87** als hellgelber Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 158.2 - 160.7 °C

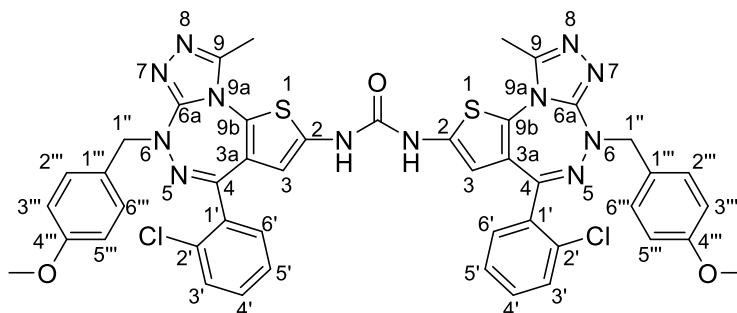
$^1\text{H-NMR}$
(500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 7.39 - 7.36 (m, 2H, 3'-H, 4'-H), 7.35 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 2'''-H, 6'''-H), 7.29 (ddd, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, 5.3 Hz, $^4J = 3.5 \text{ Hz}$, 1H, 5'-H), 7.12 (ddd, $^3J = 7.5 \text{ Hz}$, $^4J = 1.5 \text{ Hz}$, $^5J = 0.8 \text{ Hz}$, 1H, 6'-H), 6.87 (d, $^3J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, 3'''-H, 5'''-H), 6.65 (s, 1H, 3-H), 5.68 (s, 1H, NH), 4.96 (s, 2H, 1''-H), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 2.64 (s, 3H, 9-H), 1.41 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-NMR}$
(125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 159.6 (C=O), 158.9 (C-4'''), 158.1 (C-4), 157.2 (C-6a), 147.9 (C-9), 139.2 (C-9b), 136.5 (C-2), 134.9 (C-1'), 133.1 (C-2'), 131.5 (C-6'), 131.1 (C-4'), 130.7 (C-2'', C-6''), 130.3 (C-3'), 129.3 (C-3a), 129.1 (C-1'''), 127.2 (C-5'), 124.3 (C-3), 113.6 (C-3'', C-5''), 57.4 (C-1''), 55.3 (OCH_3), 52.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 12.6 (9-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3341 w, 3064 w, 3001 w, 2932 w, 2834 w, 1633 m, 1533 s, 1513 s, 1479 w, 1418 w, 1363 w, 1302 m, 1248 m, 1216 w, 1175 w, 1034 m, 822 w, 760 w, 733 w.

MS (ESI+):	$m/z = 537, 535 [M+H]^+$.
HR-MS (ESI+):	$m/z = 535.1683 [M+H]^+$ (berechnet für $C_{27}H_{28}ClN_6O_2S^+$ 535.1683).
HPLC-Reinheit:	t_r (254 nm): 3.164 min, > 99 %.
DC:	R_f (Ethylacetat/ <i>n</i> -Pentan 2:1) = 0.37

1,3-Bis(4-(2-chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin-2-yl)harnstoff (88)



129.0 (C-1'''), 127.4 (C-9b), 127.3 (C-5'), 125.3 (C-3a), 113.4 (C-3''', C-5'''), 106.7 (C-3), 56.7 (C-1''), 54.9 (OCH₃), 12.0 (9-CH₃).

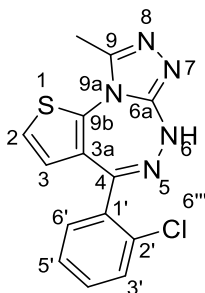
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3475 w, 3250 w, 3071 w, 2929 w, 1593 s, 1542 s, 1512 s, 1426 m, 1286 s, 1250 s, 1174 w, 1087 w, 1037 m, 817 w, 764 w, 733 w, 659 w.

MS (ESI-): m/z = 929, 927, 925 [M-H]⁻.

HR-MS (ESI-): m/z = 925.1774 [M-H]⁻ (berechnet für C₄₅H₃₅Cl₂N₁₂O₃S₂⁻ 925.1774).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 0.975 min, > 99 %.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 95:5) = 0.29

4-(2-Chlorphenyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (89)C₁₄H₁₀ClN₅S

M = 315.78 g/mol

Bei 0 °C werden 50 mg (0.14 mmol) 4-(2-Chlorphenyl)-6-(4-methoxybenzyl)-9-methyl-6*H*-thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[3,4-*c*][1,2,4]triazepin (**63**) in 1.0 mL Dichlormethan gelöst und mit 26 mg (0.14 mmol) *N*-Bromsuccinimid sowie 39 mg (0.14 mmol) Aluminiumbromid versetzt. Die Lösung wird daraufhin 0.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und mittels Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol 99:1 bis 95:5) aufgereinigt. Es werden 7 mg (0.02 mmol, 16 %) **89** als brauner Feststoff erhalten.

Schmelzpunkt: 226.4 °C

¹H-NMR
(500 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 7.86 (s, 1H, NH), 7.46 (ddd, ³*J* = 7.2 Hz, ⁴*J* = 1.6 Hz, ⁵*J* = 0.8 Hz, 1H, 6'-H), 7.42 - 7.35 (m, 3H, 3'-H, 4'-H, 5'-H), 7.11 (d, ³*J* = 5.7 Hz, 1H, 2-H), 6.49 (d, ³*J* = 5.7 Hz, 1H, 3-H), 2.61 (s, 3H, 9-CH₃).

¹³C-NMR
(125 MHz, CD₂Cl₂): δ (ppm) = 157.2 (C-4), 156.1 (C-6a), 148.5 (C-9), 136.4 (C-9b), 136.0 (C-1'), 133.4 (C-2'), 131.5 (C-6'), 131.3 (C-4'), 130.4 (C-3'), 128.9 (C-3a), 127.5 (C-5'), 127.1 (C-3), 120.9 (C-2), 12.8 (9-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3215 w, 3073 w, 2927 w, 2853 w, 1711 w, 1561 s, 1497 m, 1433 m, 1413 s, 1308 w, 1254 m, 1117 w, 1031 m, 980 w, 924 w, 867 m, 758 m, 699 m.

MS (ESI⁺): *m/z* = 318, 316 [M+H]⁺.

HR-MS (ESI+): $m/z = 316.0420$ $[M+H]^+$ (berechnet für $C_{14}H_{11}ClN_5S^+$ 316.0424).

HPLC-Reinheit: t_r (254 nm): 1.514 min, > 99 %.

5.4 Biologische Testmethoden

Thermal Shift Assays

Diese Experimente wurden am SGC der Universität Oxford durchgeführt. Mit Hilfe des *Thermal Shift Assays* wurden alle Zielverbindungen getestet.

In einem RT-PCR-Gerät werden die *Thermal Shift Assays* durchgeführt. Die Proteine werden in 10 mM HEPES-Puffer pH 7.5 und 500 mM Natriumchlorid-Lösung gepuffert und in 96-Well-Platten mit einer Endkonzentration von 2 µM in 20 µL Volumen gegeben. Die Verbindungen werden in einer Endkonzentration von 10 µM zugegeben. SYPRO® Orange wird in einer Verdünnung von 1:1000 zugesetzt. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge wird auf 465 nm und 590 nm festgesetzt. Die Temperatur wird um 3 °C pro Minute von 25 °C auf 96 °C erhöht, dabei wird die Fluoreszenz nach jeder Minute gemessen.

AlphaScreens

Diese Experimente wurden am SGC der Universität Oxford durchgeführt. AlphaScreens wurden überwiegend von den Triazolothienotriazepinen sowie dem Triazolobenzotriazepin **21d** erstellt. Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte wurden die AlphaScreens, wie vom Hersteller (PerkinElmer, USA) beschrieben, verwendet.

Alle Reagenzien werden in 25 mM HEPES, 100 mM NaCl-Lösung und 0.1 % BSA, pH 7.4 ergänzt mit 0.05 % CHAPS gelöst und vor dem Auftragen auf die Assay-Platten auf Raumtemperatur equilibriert. Die Liganden wurden 11-mal in 1:2.5 Stufen in einem Bereich von 5000 - 0.2 nM verdünnt. Der Assay wurde in low-volume ProxiPlate™-384 Plus Assay-Platten (PerkinElmer) bei Raumtemperatur durchgeführt. 0.1 µL des Liganden werden zu 5 µL Assay-Puffer gegeben, gefolgt von 7 µL des biotinylierten Peptids und dem His-getaggten Proteins in einer Endkonzentration von 50 nM. Die Platten werden mit Folie versiegelt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 8 µL einer Mischung aus Streptavidin ummantelte Donor-Beads und Nickelchelate-Akzeptor-Beads (jeweils 12.5 µg/mL) bei geringem Licht zugegeben werden. Die Platten werden mit Folie versiegelt, um diese vor Licht zu schützen. Anschließend wurden weitere 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit einem PHERAstar FS *plate reader* (BMG Labtech) unter Verwendung des AlphaScreen 680 nm Anregungs-/570 nm Emissionsfilterset ausgelesen. Die gemessenen Werte werden nach Normalisierung mit korrespondierenden DMSO-Kontrollen mit Prism 5 (GraphPad Software, USA) ausgewertet.

Proteinkristallographie

Diese Experimente wurden am SGC der Universität Oxford durchgeführt. Es wurden drei Co-Kristallstrukturen **21e** an BRD4(1), **32** an BRD4(1) und **33c** an BRD2(2)) hergestellt und vermessen.

Agar-Diffusionstest

Von den zu testenden Verbindungen werden 1 %ige (m/V) Stammlösungen in Dimethylsulfoxid hergestellt und davon jeweils 3.0 µL auf Testplättchen (Durchmesser 6 mm) der Firma Macherey-Nagel aufgetragen, was einer Menge von 30 µg Substanz pro Filterplättchen entspricht. Das antimykotisch wirksame Clotrimazol und das antibiotisch aktive Tetracyclin werden als Referenzsubstanzen verwendet. Von diesen Referenzen werden 1 %ige (m/V) Stammlösungen in Dimethylsulfoxid hergestellt. Jeweils 3.0 µL dieser Referenzlösungen werden auf Rundfilter aufgetragen, was einer Menge von 30 µg Substanz pro Filterplättchen entspricht. Die Blindwerte werden durch Auftragen von 3.0 µL reinem Dimethylsulfoxid pro Rundfilter gemessen. Die Testplättchen werden vor dem Aufbringen auf die Testplatten 24 h zum Trocknen ausgelegt.

Die Pilze und Bakterien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen und entsprechend der mitgelieferten Vorschriften in Flüssigkultur angezüchtet. Als Nährmedium wird für *Candida glabrata*, *Hyphopichia burtonii*, *Yarrowia lipolytica*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas marginalis*, ein All-Culture Agar (AC-Agar) der Firma Sigma verwendet. Für die Herstellung des Nährmediums werden 35.2 g AC-Agar und 20 g Agar in 1.0 L Wasser suspendiert und anschließend autoklaviert. Für *Streptococcus entericus* und *Staphylococcus equorum* wird ein Agar aus 10.0 g Caseinpepton, 5.0 g Hefeextrakt, 5.0 g Glucose und 5.0 g Natriumchlorid in 1.0 L Wasser genutzt, welcher ebenfalls autoklaviert wird. Unter sterilen Arbeitsbedingungen werden je 15 mL des noch warmen, flüssigen Agars in Petrischalen gefüllt und dann mindestens 1 h bei 8 °C gekühlt, bis der Agar erstarrt ist. Für den Schimmelpilz *Aspergillus niger* dient ein Potato Agar als Nährmedium. Hierzu werden zur Herstellung 32 g Potato Dextrose Agar und 20 g Agar in 1.0 L Wasser suspendiert und autoklaviert. Unter sterilen Arbeitsbedingungen werden ebenfalls je 15 ml des noch warmen, flüssigen Agars in Petrischalen gefüllt und dann mindestens 1 h bei 8 °C gekühlt.

Die erstarrten Agar-Böden werden mit einem in der Flüssigkultur des jeweiligen Keims getränkten Wattestäbchen bestrichen und sofort mit vier Substanzplättchen, sowie dem als Blindwert und dem als Referenz präparierten Plättchen belegt. Anschließend werden die

präparierten Agar-Platten 36 h bei 32.1 °C (für Bakterien) beziehungsweise bei 28.0 °C (für Pilze) inkubiert. Der Durchmesser der Hemmhöfe wird manuell ausgemessen.

MTT-Test

Der MTT-Test wird an Zellen der humanen Leukämiezelllinie HL-60 durchgeführt. Die Zellzahl pro Milliliter wird auf 9×10^5 Zellen eingestellt. Hierzu wird die aktuelle Zelldichte der Kultur mittels einer Hämocyten-Zählkammer (Fuchs-Rosenthal) bestimmt und die Zellsuspension in einer Petrischale auf die erforderliche Zelldichte mit Medium verdünnt. Anschließend werden in einer 96-Wellplatte je 99 µL Zellsuspension pro Well ausgesät und 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Von den zu untersuchenden Testsubstanzen werden jeweils 10 mM Stammlösungen in Dimethylsulfoxid hergestellt, welche dann sechsmal nacheinander im Verhältnis 1:2 verdünnt werden. Der Nullwert enthält 1 µL Dimethylsulfoxid. Die Kontrollzellen werden mit reinem Nährmedium versetzt. Als Positivkontrolle wird eine Triton® X-100-Lösung in einer Endkonzentration von 1 µg/mL zugesetzt. Von jeder Testlösung bzw. von reinem Dimethylsulfoxid und von der Triton® X-100-Stammlösung werden je 1 µL in je ein Well, welches schon mit 99 µL der HL-60 Zellsuspension befüllt ist, pipettiert und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wird jedes Well mit 10 µL MTT-Lösung (5 mg MTT in 1.0 mL PBS) versetzt und weitere 2 h unter den oben angeführten Bedingungen inkubiert. Danach werden 190 µL Dimethylsulfoxid zugesetzt und nach 1 h sowie gelegentlichem Rütteln wird die Platte photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenläng 630 nm) in einem ELISA-Reader (SLT Spectra, Crailsheim) vermessen. Die statistische Auswertung sowie die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgt mit Hilfe der Prism 4 Software (GraphPad, USA).

7. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Äq.	Äquivalent
ar	Aryl
BET	<i>bromodomain and extra-terminal</i>
BRD [Nummer]	Bromodomänen-beinhaltendes Protein [Nummer]
BzT	Benzotriazepin
c	Konzentration
C	Cytosin
CAN	Cer(IV)-ammoniumnitrat
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CTM	C-terminales Motiv
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Boc	<i>tert</i> -Butylcarbonat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat
δ	Chemische Verschiebung (NMR)
Δ	zum Rückfluss erhitzen
d	Dublett (NMR)
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethan
dd	Dublett von Dublett (NMR)
DEPT	<i>distortionsless enhancement by polarisation transfer</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMA	Dimethylacetamid
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisation

ET	Extraterminale Domäne
Et ₂ NH	Diethylamin
Et ₃ N	Triethylamin
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FT	Fourier Transformation
G	Guanin
H [Nummer]	Histon [Nummer]
HAT	Histonacetyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR-MS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
iPr	isopropyl
IR	Infrarot
KAc	acetyliertes Lysin
LiHMDS	Lithiumhexamethyldisilazid
λ	Wellenlänge
m	Multiplett (NMR)
M	Molmasse
Me	Methyl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MLL	<i>mixed lineage leukemia</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
NAD(P)	Nicotin-Adenin-Dinukleotid (Phosphat)
NFSI	<i>N</i> -Fluorbenzensulfonamid
NMC	<i>NUT midline carcinoma</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NUT	<i>nuclear protein in testis</i>
PB1	Polybromodomäne-1
PDB	Protein Datenbank
Pd ₂ (dba) ₃	Tris(dibenzylidenaceton)dipalladium(0)
Pd(dppf)Cl ₂	[1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen]dichlorpalladium(II)

PMB	Paramethoxybenzyl
ppm	<i>parts per million</i>
PTSA	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure-Monohydrat
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
SGC	Structural Genomics Consortium
t	Triplett (NMR)
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
<i>t</i> BuNH ₂	<i>tert</i> -Butylamin
<i>t</i> BuOH	<i>tert</i> -Butylalkohol
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	Tetramethylethylendiamin
TMP	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin
TMS	Tetramethylsilan
TMSN ₃	Trimethylsilylazid
Ts	Tosyl
UV	Ultraviolett

7. Abkürzungsverzeichnis

Aminosäure	Dreibuchstaben- code	Einbuchstaben- code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8. Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4 Edition, Garland Science, New York, **2002**.
- [2] R. D. Kornberg, *Annual review of biochemistry* **1977**, *46*, 931-954.
- [3] Z. Su, J. M. Denu, *ACS Chemical Biology* **2015**, DOI: 10.1021.
- [4] K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond, *Nature* **1997**, *389*, 251-260.
- [5] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [6] A. J. Bannister, T. Kouzarides, *Cell Research* **2011**, *21*, 381-395.
- [7] S. W. Harshman, N. L. Young, M. R. Parthun, M. A. Freitas, *Nucleic Acids Research* **2013**, *41*, 9593-9609.
- [8] V. G. Allfrey, R. Faulkner, A. E. Mirsky, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1964**, *51*, 786-794.
- [9] P. Trojer, D. Reinberg, *Molecular Cell* **2007**, *28*, 1-13.
- [10] A. Portela, M. Esteller, *Nature Biotechnology* **2010**, *28*, 1057-1068.
- [11] a) A. Bird, *Nature* **2007**, *447*, 396-398; b) A. Meissner, *Nature Biotechnology* **2010**, *28*, 1079-1088.
- [12] R. Jaenisch, A. Bird, *Nature Genetics* **2003**, *33*, 245-254.
- [13] K. D. Robertson, *Nature Review Genetics* **2005**, *6*, 597-610.
- [14] M. Okano, S. Xie, E. Li, *Nature Genetics* **1998**, *19*, 219-220.
- [15] M. Ehrlich, M. A. Gama-Sosa, L.-H. Huang, R. M. Midgett, K. C. Kuo, R. A. McCune, C. Gehrke, *Nucleic Acids Research* **1982**, *10*, 2709-2721.
- [16] L. D. Moore, T. Le, G. Fan, *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 23-38.
- [17] A. Bird, *Genes & Development* **2002**, *16*, 6-21.
- [18] J. A. Yoder, C. P. Walsh, T. H. Bestor, *Trends in Genetics* **1997**, *13*, 335-340.
- [19] A. Bird, M. Taggart, M. Frommer, O. J. Miller, D. Macleod, *Cell* **1985**, *40*, 91-99.
- [20] R. Straussman, D. Nejman, D. Roberts, I. Steinfeld, B. Blum, N. Benvenisty, I. Simon, Z. Yakhini, H. Cedar, *Nature Structural and Molecular Biology* **2009**, *16*, 564-571.
- [21] S. Kacem, R. Feil, *Mammalian Genome* **2009**, *20*, 544-556.

- [22] a) L. Lopez-Serra, M. Esteller, *British Journal of Cancer* **2008**, 98, 1881-1885; b) M. Esteller, *Human Molecular Genetics* **2007**, 16, R50-R59.
- [23] A. Kuroda, T. A. Rauch, I. Todorov, H. T. Ku, I. H. Al-Abdullah, F. Kandeel, Y. Mullen, G. P. Pfeifer, K. Ferreri, *PLoS ONE* **2009**, 4, e6953.
- [24] J. P. Thomson, P. J. Skene, J. Selfridge, T. Clouaire, J. Guy, S. Webb, A. R. W. Kerr, A. Deaton, R. Andrews, K. D. James, D. J. Turner, R. Illingworth, A. Bird, *Nature* **2010**, 464, 1082-1086.
- [25] K. Rai, I. J. Huggins, S. R. James, A. R. Karpf, D. A. Jones, B. R. Cairns, *Cell* **2008**, 135, 1201-1212.
- [26] a) S. Ito, A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers, Y. Zhang, *Nature* **2010**, 466, 1129-1133; b) M. Tahiliani, K. P. Koh, Y. Shen, W. A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L. M. Iyer, D. R. Liu, L. Aravind, A. Rao, *Science* **2009**, 324, 930-935.
- [27] Junjie U. Guo, Y. Su, C. Zhong, G.-I. Ming, H. Song, *Cell* **2011**, 145, 423-434.
- [28] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S. C. Wu, L. B. Collins, J. A. Swenberg, C. He, Y. Zhang, *Science* **2011**, 333, 1300-1303.
- [29] R. K. Chodavarapu, S. Feng, Y. V. Bernatavichute, P.-Y. Chen, H. Stroud, Y. Yu, J. A. Hetzel, F. Kuo, J. Kim, S. J. Cokus, D. Casero, M. Bernal, P. Huijser, A. T. Clark, U. Kramer, S. S. Merchant, X. Zhang, S. E. Jacobsen, M. Pellegrini, *Nature* **2010**, 466, 388-392.
- [30] D. Zilberman, D. Coleman-Derr, T. Ballinger, S. Henikoff, *Nature* **2008**, 456, 125-129.
- [31] H. K N, M. Z. Chow, E. K. Baker, S. Pal, S. Bassal, D. Brasacchio, L. Wang, J. M. Craig, P. L. Jones, S. Sif, A. El-Osta, *Nature Genetics* **2005**, 37, 254-264.
- [32] J. Wysocka, T. Swigut, H. Xiao, T. A. Milne, S. Y. Kwon, J. Landry, M. Kauer, A. J. Tackett, B. T. Chait, P. Badenhorst, C. Wu, C. D. Allis, *Nature* **2006**, 442, 86-90.
- [33] C. H. Arrowsmith, C. Bountra, P. V. Fish, K. Lee, M. Schapira, *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, 11, 384-400.
- [34] K. Sakabe, Z. Wang, G. W. Hart, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, 107, 19915-19920.
- [35] P. O. Hassa, S. S. Haenni, M. Elser, M. O. Hottiger, *Microbiology and molecular biology reviews* **2006**, 70, 789-829.
- [36] J. Kim, M. Guermah, R. K. McGinty, J.-S. Lee, Z. Tang, T. A. Milne, A. Shilatifard, T. W. Muir, R. G. Roeder, *Cell* **2009**, 137, 459-471.

- [37] Y. Shiio, R. N. Eisenman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, 13225-13230.
- [38] H. Santos-Rosa, A. Kirmizis, C. Nelson, T. Bartke, N. Saksouk, J. Cote, T. Kouzarides, *Nature Structural and Molecular Biology* **2009**, 16, 17-22.
- [39] C. J. Nelson, H. Santos-Rosa, T. Kouzarides, *Cell* **2006**, 126, 905-916.
- [40] Y. Wei, C. A. Mizzen, R. G. Cook, M. A. Gorovsky, C. D. Allis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95, 7480-7484.
- [41] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin, **2003**.
- [42] S. S. Ng, W. W. Yue, U. Oppermann, R. J. Klose, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2009**, 66, 407-422.
- [43] J. Kim, J. Daniel, A. Espejo, A. Lake, M. Krishna, L. Xia, Y. Zhang, M. T. Bedford, *EMBO reports* **2006**, 7, 397-403.
- [44] K. S. Champagne, T. G. Kutateladze, *Current Drug Targets* **2009**, 10, 432-441.
- [45] Y. Huang, J. Fang, M. T. Bedford, Y. Zhang, R.-M. Xu, *Science* **2006**, 312, 748-751.
- [46] S. C. Hodawadekar, R. Marmorstein, *Oncogene* **2007**, 26, 5528-5540.
- [47] K. Marushige, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1976**, 73, 3937-3941.
- [48] X. J. Yang, E. Seto, *Oncogene* **2007**, 26, 5310-5318.
- [49] M. R. Parthun, *Oncogene* **2007**, 26, 5319-5328.
- [50] P. Filippakopoulos, S. Picaud, M. Mangos, T. Keates, J.-P. Lambert, D. Barsyte-Lovejoy, I. Felletar, R. Volkmer, S. Müller, T. Pawson, A.-C. Gingras, Cheryl H. Arrowsmith, S. Knapp, *Cell* **2012**, 149, 214-231.
- [51] J. W. Tamkun, R. Deuring, M. P. Scott, M. Kissinger, A. M. Pattatucci, T. C. Kaufman, J. A. Kennison, *Cell* **1992**, 68, 561-572.
- [52] S. Muller, P. Filippakopoulos, S. Knapp, *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2011**, 13, e29.
- [53] Y. Xue, J. C. Canman, C. S. Lee, Z. Nie, D. Yang, G. T. Moreno, M. K. Young, E. D. Salmon, W. Wang, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, 97, 13015-13020.
- [54] D. S. Hewings, T. P. C. Rooney, L. E. Jennings, D. A. Hay, C. J. Schofield, P. E. Brennan, S. Knapp, S. J. Conway, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 9393-9413.

- [55] Y. Dou, T. A. Milne, A. J. Tackett, E. R. Smith, A. Fukuda, J. Wysocka, C. D. Allis, B. T. Chait, J. L. Hess, R. G. Roeder, *Cell* **2005**, 121, 873-885.
- [56] A. J. Deshpande, J. Bradner, S. A. Armstrong, *Trends in Immunology*, 33, 563-570.
- [57] E. Kalkhoven, *Biochemical Pharmacology* **2004**, 68, 1145-1155.
- [58] F. Wang, C. Marshall, M. Ikura, *Cellular and Molecular Life Sciences* **2013**, 70, 3989-4008.
- [59] J. Wang, I. C. G. Weaver, A. Gauthier-Fisher, H. Wang, L. He, J. Yeomans, F. Wondisford, D. R. Kaplan, F. D. Miller, *Developmental Cell* **2010**, 18, 114-125.
- [60] G. Chen, X. Zou, H. Watanabe, J. M. van Deursen, J. Shen, *The Journal of Neuroscience* **2010**, 30, 13066-13077.
- [61] M. Thompson, *Biochimie* **2009**, 91, 309-319.
- [62] A. Rada-Iglesias, R. Bajpai, T. Swigut, S. A. Brugmann, R. A. Flynn, J. Wysocka, *Nature* **2011**, 470, 279-283.
- [63] H. M. Rowe, J. Jakobsson, D. Mesnard, J. Rougemont, S. Reynard, T. Aktas, P. V. Maillard, H. Layard-Liesching, S. Verp, J. Marquis, F. Spitz, D. B. Constam, D. Trono, *Nature* **2010**, 463, 237-240.
- [64] D. A. Wassarman, F. Sauer, *Journal of Cell Science* **2001**, 114, 2895-2902.
- [65] P. Filippakopoulos, S. Knapp, *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, 13, 337-356.
- [66] S. Rahman, M. E. Sowa, M. Ottinger, J. A. Smith, Y. Shi, J. W. Harper, P. M. Howley, *Molecular and Cellular Biology* **2011**, 31, 2641-2652.
- [67] P. Garcia-Gutierrez, M. Mundi, M. Garcia-Dominguez, *Journal of Cell Science* **2012**, 125, 3671-3680.
- [68] C.-M. Chiang, *F1000 Biology Reports* **2009**, 1, 98.
- [69] S. Picaud, C. Wells, I. Felletar, D. Brotherton, S. Martin, P. Savitsky, B. Diez-Dacal, M. Philpott, C. Bountra, H. Lingard, O. Fedorov, S. Müller, P. E. Brennan, S. Knapp, P. Filippakopoulos, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, 110, 19754-19759.
- [70] G. LeRoy, B. Rickards, S. J. Flint, *Molecular Cell* **2008**, 30, 51-60.
- [71] Z. Yang, N. He, Q. Zhou, *Molecular and Cellular Biology* **2008**, 28, 967-976.
- [72] J. Hnilicová, S. Hozeifi, E. Stejskalová, E. Dušková, I. Poser, J. Humpolíčková, M. Hof, D. Staněk, *Molecular Biology of the Cell* **2013**, 24, 3557-3568.

- [73] R. Gamsjaeger, S. R. Webb, J. M. Lamonica, A. Billin, G. A. Blobel, J. P. Mackay, *Molecular and Cellular Biology* **2011**, 31, 2632-2640.
- [74] B. N. Devaiah, B. A. Lewis, N. Cherman, M. C. Hewitt, B. K. Albrecht, P. G. Robey, K. Ozato, R. J. Sims, D. S. Singer, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, 109, 6927-6932.
- [75] R. Zhao, T. Nakamura, Y. Fu, Z. Lazar, D. L. Spector, *Nature Cell Biology* **2011**, 13, 1295-1304.
- [76] C. V. Dang, A. Le, P. Gao, *Clinical Cancer Research* **2009**, 15, 6479-6483.
- [77] J. Moriniere, S. Rousseaux, U. Steuerwald, M. Soler-Lopez, S. Curtet, A.-L. Vitte, J. Govin, J. Gaucher, K. Sadoul, D. J. Hart, J. Krijgsveld, S. Khochbin, C. W. Muller, C. Petosa, *Nature* **2009**, 461, 664-668.
- [78] C. A. French, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2012**, 7, 247-265.
- [79] C. A. French, I. Miyoshi, I. Kubonishi, H. E. Grier, A. R. Perez-Atayde, J. A. Fletcher, *Cancer Research* **2003**, 63, 304-307.
- [80] C. A. French, *Journal of Clinical Pathology* **2010**, 63, 492-496.
- [81] a) Y. H. Kim, L. Girard, C. P. Giacomini, P. Wang, T. Hernandez-Boussard, R. Tibshirani, J. D. Minna, J. R. Pollack, *Oncogene* **2005**, 25, 130-138; b) C. V. Dang, *Cell cycle* **2009**, 8, 3243-3245.
- [82] Y. Naka, K. Haga, M. Hosoya, US5439905 A, **1995**.
- [83] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, J. E. Bradner, *Nature* **2010**, 468, 1067-1073.
- [84] E. Nicodeme, K. L. Jeffrey, U. Schaefer, S. Beinke, S. Dewell, C.-w. Chung, R. Chandwani, I. Marazzi, P. Wilson, H. Coste, J. White, J. Kirilovsky, C. M. Rice, J. M. Lora, R. K. Prinjha, K. Lee, A. Tarakhovsky, *Nature* **2010**, 468, 1119-1123.
- [85] Jake E. Delmore, Ghayas C. Issa, Madeleine E. Lemieux, Peter B. Rahl, J. Shi, Hannah M. Jacobs, E. Kastritis, T. Gilpatrick, Ronald M. Paranal, J. Qi, M. Chesi, Anna C. Schinzel, Michael R. McKeown, Timothy P. Heffernan, Christopher R. Vakoc, P. L. Bergsagel, Irene M. Ghobrial, Paul G. Richardson, Richard A. Young, William C. Hahn, Kenneth C. Anderson, Andrew L. Kung, James E. Bradner, Constantine S. Mitsiades, *Cell* **2011**, 146, 904-917.

- [86] Martin M. Matzuk, Michael R. McKeown, P. Filippakopoulos, Q. Li, L. Ma, Julio E. Agno, Madeleine E. Lemieux, S. Picaud, Richard N. Yu, J. Qi, S. Knapp, James E. Bradner, *Cell* **2012**, 150, 673-684.
- [87] Y. Zhao, C.-Y. Yang, S. Wang, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 7498-7500.
- [88] J. Seal, Y. Lamotte, F. Donche, A. Bouillot, O. Mirguet, F. Gellibert, E. Nicodeme, G. Krysa, J. Kirilovsky, S. Beinke, S. McCleary, I. Rioja, P. Bamborough, C.-W. Chung, L. Gordon, T. Lewis, A. L. Walker, L. Cutler, D. Lugo, D. M. Wilson, J. Witherington, K. Lee, R. K. Prinjha, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 2968-2972.
- [89] S. Picaud, D. Da Costa, A. Thanasopoulou, P. Filippakopoulos, P. V. Fish, M. Philpott, O. Fedorov, P. Brennan, M. E. Bunnage, D. R. Owen, J. E. Bradner, P. Taniere, B. O'Sullivan, S. Müller, J. Schwaller, T. Stankovic, S. Knapp, *Cancer Research* **2013**, 73, 3336-3346.
- [90] R. Gosmini, V. L. Nguyen, J. Toum, C. Simon, J.-M. G. Brusq, G. Krysa, O. Mirguet, A. M. Riou-Eymard, E. V. Boursier, L. Trottet, P. Bamborough, H. Clark, C.-w. Chung, L. Cutler, E. H. Demont, R. Kaur, A. J. Lewis, M. B. Schilling, P. E. Soden, S. Taylor, A. L. Walker, M. D. Walker, R. K. Prinjha, E. Nicodème, *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 8111-8131.
- [91] L. Zhao, Y. Wang, D. Cao, T. Chen, Q. Wang, Y. Li, Y. Xu, N. Zhang, X. Wang, D. Chen, L. Chen, Y.-L. Chen, G. Xia, Z. Shi, Y.-C. Liu, Y. Lin, Z. Miao, J. Shen, B. Xiong, *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58, 1281-1297.
- [92] D. Gallenkamp, K. A. Gelato, B. Haendler, H. Weinmann, *ChemMedChem* **2014**, 9, 438-464.
- [93] M. A. Wrobel, *Dissertation LMU München* **2013**.
- [94] P. Filippakopoulos, S. Picaud, O. Fedorov, M. Keller, M. Wrobel, O. Morgenstern, F. Bracher, S. Knapp, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20, 1878-1886.
- [95] A. Puissant, S. M. Frumm, G. Alexe, C. F. Bassil, J. Qi, Y. H. Chanthery, E. A. Nekritz, R. Zeid, W. C. Gustafson, P. Greninger, M. J. Garnett, U. McDermott, C. H. Benes, A. L. Kung, W. A. Weiss, J. E. Bradner, K. Stegmaier, *Cancer Discovery* **2013**, 3, 308-323.
- [96] T. Nakamura, Y. Koga, M. Shindo, *WO 9.616.062*, **1996**.
- [97] P. Richter, W. Buhrow, *Pharmazie* **1979**, 34, 663.
- [98] Y. Yamamoto, M. Shindo, T. Nakamura, Japan Tobacco Inc., *WO9747622A1*, **1997**.
- [99] H. Sueoka, S. Ehara, H. Kobayashi, T. Arichi, H. Komatsu, *US5712274 A*, **1998**.

- [100] M. Gütschow, U. Neumann, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 1729-1740.
- [101] S. C. Bell, S. J. Childress, *U.S. Patent 3.714.145*, **1973**.
- [102] F. G. Bordwell, G. Z. Ji, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 8398-8401.
- [103] W. Walter, H.-W. Meyer, A. Lehmann, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1974**, *5*, 765-775.
- [104] C. Roussel, M. Roman, F. Andreoli, A. Del Rio, R. Faure, N. Vanthuyne, *Chirality* **2006**, *18*, 762-771.
- [105] V. S. Bryantsev, B. P. Hay, *The Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 4678-4688.
- [106] J.-J. Liu, K.-C. Luk, G. Pizzolato, Y. Ren, K. C. Thakker, P. M. Wovkulich, Z. Zhang, *U.S. Patent 79511*, **2006**.
- [107] J. Yin, S. L. Buchwald, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 6043-6048.
- [108] M. Kranenburg, Y. E. M. van der Burgt, P. C. J. Kamer, P. W. N. M. van Leeuwen, K. Goubitz, J. Fraanje, *Organometallics* **1995**, *14*, 3081-3089.
- [109] J. F. Hartwig, S. Richards, D. Barañano, F. Paul, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 3626-3633.
- [110] T. Maejima, Y. Shimoda, K. Nozaki, S. Mori, Y. Sawama, Y. Monguchi, H. Sajiki, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1712-1722.
- [111] G. M. Bacani, S. D. Bembenek, W. Eccles, J. P. Edwards, M. T. Epperson, L. Gomez, C. A. Grice, A. M. Kearney, A. M. Landry-bayle, A. Lee-dutra, K. J. McClure, T. Mirzadegan, A. Santillan Jr., *U.S. Patent 111794*, **2009**.
- [112] K. Sonogashira, Y. Tohda, N. Hagihara, *Tetrahedron Letters* **1975**, *16*, 4467-4470.
- [113] R. D. Stephens, C. E. Castro, *The Journal of Organic Chemistry* **1963**, *28*, 3313-3315.
- [114] T. Tremmel, F. Bracher, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4640-4646.
- [115] C. Paal, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1885**, *18*, 367-371.
- [116] K. Gewald, E. Schinke, H. Böttcher, *Chemische Berichte* **1966**, *99*, 94-100.
- [117] K. Gewald, *Angewandte Chemie* **1961**, *73*, 114-114.
- [118] R. W. Sabnis, D. W. Rangnekar, N. D. Sonawane, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1999**, *36*, 333-345.

- [119] O. Mirguet, R. Gosmini, J. Toum, C. A. Clément, M. Barnathan, J.-M. Brusq, J. E. Mordaunt, R. M. Grimes, M. Crowe, O. Pineau, M. Ajakane, A. Daugan, P. Jeffrey, L. Cutler, A. C. Haynes, N. N. Smithers, C.-w. Chung, P. Bamborough, I. J. Uings, A. Lewis, J. Witherington, N. Parr, R. K. Prinjha, E. Nicodème, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 7501-7515.
- [120] P. Richter, U. Scheefeldt, *Pharmazie* **1991**, 46, 701-705.
- [121] M. Di Braccio, G. Grossi, G. Roma, L. Vargiu, M. Mura, M. E. Marongiu, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 36, 935-949.
- [122] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1994**.
- [123] S. E. Manahan, *Toxicological Chemistry*, 2. Edition., Michigan, **1992**.
- [124] C. E. Tranberg, A. Zickgraf, B. N. Giunta, H. Luetjens, H. Figler, L. J. Murphree, R. Falke, H. Fleischer, J. Linden, P. J. Scammells, R. A. Olsson, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, 382-389.
- [125] G. Sathishkannan, K. Srinivasan, *Chemical Communications* **2014**, 50, 4062-4064.
- [126] T. Hirohashi, S. Inaba, H. Yamamoto, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1975**, 48, 147-156.
- [127] M. P. Cava, M. I. Levinson, *Tetrahedron* **1985**, 41, 5061-5087.
- [128] G. Eller, W. Holzer, *Molecules* **2006**, 11, 371.
- [129] C. Ballatore, A. Crowe, F. Piscitelli, M. James, K. Lou, G. Rossidivito, Y. Yao, J. Q. Trojanowski, V. M. Y. Lee, K. R. Brunden, A. B. Smith Iii, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, 20, 4451-4461.
- [130] P. Berrouard, S. Dufresne, A. Pron, J. Veilleux, M. Leclerc, *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, 77, 8167-8173.
- [131] M. Rey, T. Vergnani, A. S. Dreiding, *Helvetica Chimica Acta* **1985**, 68, 1828-1834.
- [132] N. Ganguly, A. K. Sukai, S. De, *Synthetic Communications* **2001**, 31, 301-309.
- [133] S. Wang, Z. Ni, X. Huang, J. Wang, Y. Pan, *Organic Letters* **2014**, 16, 5648-5651.
- [134] F. M. Piller, P. Knochel, *Organic Letters* **2009**, 11, 445-448.
- [135] A. Krasovskiy, V. Krasovskaya, P. Knochel, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 2958-2961.
- [136] C. R. Hauser, H. G. Walker, *Journal of the American Chemical Society* **1947**, 69, 295-297.

- [137] B. Haag, M. Mosrin, H. Ila, V. Malakhov, P. Knochel, *Angewandte Chemie* **2011**, 123, 9968-9999.
- [138] B. P. Fors, P. Krattiger, E. Strieter, S. L. Buchwald, *Organic Letters* **2008**, 10, 3505-3508.
- [139] M. Bjoerk, S. Grivas, *Journal of heterocyclic chemistry* **2006**, 43, 101-109.
- [140] E. V. Vinogradova, N. H. Park, B. P. Fors, S. L. Buchwald, *Organic Letters* **2013**, 15, 1394-1397.
- [141] L. R. Odell, F. Russo, M. Larhed, *Synlett* **2012**, 23, 685-698.
- [142] K. A. Parker, E. G. Gibbons, *Tetrahedron Letters* **1975**, 16, 981-984.
- [143] J. Gavenonis, T. D. Tilley, *Organometallics* **2002**, 21, 5549-5563.
- [144] R. K. Boeckman, S. W. Goldstein, M. A. Walters, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, 110, 8250-8252.
- [145] N. Meyer, D. Seebach, *Chemische Berichte* **1980**, 113, 1304-1319.
- [146] H. Kunz, H. Waldmann, *Angewandte Chemie International Edition* **1984**, 23, 71-72.
- [147] I. Stolić, K. Mišković, I. Piantanida, M. B. Lončar, L. Glavaš-Obrovac, M. Bajić, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46, 743-755.
- [148] a) A. W. Hofmann, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1881**, 14, 2725-2736; b) E. S. Wallis, J. F. Lane, *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, **2004**.
- [149] T. Laue, A. Plagens, *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie*, 5 Edition, Teubner Verlag, Wiesbaden, **2006**.
- [150] T. Curtius, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1890**, 23, 3023-3033.
- [151] T. Shioiri, K. Ninomiya, S. Yamada, *Journal of the American Chemical Society* **1972**, 94, 6203-6205.
- [152] E. F. V. Scriven, K. Turnbull, *Chemical Reviews* **1988**, 88, 297-368.
- [153] I. A. Yule, C. W. G. Fishwick, *Synthetic Communications* **2013**, 43, 337-344.
- [154] B. Ma, W.-C. Lee, *Tetrahedron Letters* **2010**, 51, 385-386.
- [155] F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nature Protocols* **2007**, 2, 2212-2221.
- [156] J. A. Schellman, *Biophysical Journal* **1997**, 73, 2960-2964.
- [157] C. Ganesh, A. N. Shah, C. P. Swaminathan, A. Surolia, R. Varadarajan, *Biochemistry* **1997**, 36, 5020-5028.

- [158] D. E. Epps, R. W. Sarver, J. M. Rogers, J. T. Herberg, P. K. Tomich, *Analytical Biochemistry* **2001**, 292, 40-50.
- [159] en.wikipedia.org/wiki/Thermal_shift_assay **19.12.2015**.
- [160] D. Matulis, J. K. Kranz, F. R. Salemme, M. J. Todd, *Biochemistry* **2005**, 44, 5258-5266.
- [161] G. A. Holdgate, W. H. J. Ward, *Drug Discovery Today* **2005**, 10, 1543-1550.
- [162] R. M. Eglen, T. Reisine, P. Roby, N. Rouleau, C. Illy, R. Bossé, M. Bielefeld, *Current Chemical Genomics* **2008**, 1, 2-10.
- [163] www.thesgc.org/screening-platforms **18.12.2015**.
- [164] T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, 55-63.
- [165] M. Nakanishi, T. Tahara, K. Araki, M. Shiroki, T. Tsumagari, Y. Takigawa, *Journal of Medicinal Chemistry* **1973**, 16, 214-219.
- [166] C. Gálvez, F. Garcia, M. Veiga, P. Viladoms, *Synthesis* **1983**, 1983, 932-933.